

UNIVERSITE DE CLERMONT-FERRAND

FACULTE DE PHARMACIE

(U.E.R. de Pharmacie)

Année 1971

N°

THÈSE

pour le

DOCTORAT EN PHARMACIE

(Diplôme d'Etat)

présentée par

Georges VOISSIERE

Pharmacien, Maître ès Sciences

né le 4 Juillet 1941 à Saint VICTOUR (19)

Soutenue publiquement le 12 Juin 1971

APPLICATION DE L'ELECTROPHORESE
SUR COUCHES MINCES A L'ETUDE DE LA
STABILITE DES COMPLEXES EN SOLUTION.

Président : M. J.A. BERGER, Professeur

Membres du Jury : M. G. MEYNIEL, Doyen
M. J. DAUPHIN, Professeur.

Clermont-Reproduction, 64 avenue J. Noellet - AUBIERE



Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNIVERSITE DE CLERMONT-FERRAND

FACULTE DE PHARMACIE

(U.E.R. de Pharmacie)

Année 1971

N°

THÈSE

pour le

DOCTORAT EN PHARMACIE

(Diplôme d'Etat)

présentée par

Georges VOISSIERE

Pharmacien, Maître ès Sciences

né le 4 Juillet 1941 à Saint VICTOUR (19)

Soutenue publiquement le 12 Juin 1971

APPLICATION DE L'ELECTROPHORESE
SUR COUCHES MINCES A L'ETUDE DE LA
STABILITE DES COMPLEXES EN SOLUTION.

Président : M. J.A. BERGER, Professeur

Membres du Jury : M. G. MEYNIEL, Doyen
M. J. DAUPHIN, Professeur.



UNIVERSITE
DE
CLERMONT

FACULTE DE PHARMACIE

(U.E.R. DE PHARMACIE)

Doyen : M. COULET
Vice-Doyen : Mme GAILLARD

Professeurs Honoraires : Mme BLANQUET - M. VAURS.

I - Professeurs Titulaires.

MM. BASTIDE	Chimie Biologique et Pharmacodynamie
BERGER	Chimie Analytique
CLUZEL	Bactériologie
COULET	Botanique et Microbiologie
DAUPHIN	Chimie Pharmaceutique et Toxicologie
FEBVRE	Pharmacie Galénique
Mme GAILLARD	Physique Pharmaceutique
MM. POURRAT	Matière Médicale
TRONCHE	Pharmacie Chimique

II - Professeurs sans Chaire.

Mle CHATONIER	Chimie Minérale et Minéralogie
Mme POURRAT	Matière Médicale

III - Maîtres de Conférences Agrégés.

MM. ANDRAUD	Toxicologie
COUQUELET	Pharmacie Chimique
Mme PETIT	Chimie Analytique.

IV - Délégués dans les fonctions de
Maîtres de Conférences Agrégés.

M. AIACHE	Pharmacie Galénique
M. BOYER	Chimie Biologique
M. GUILLOT	Botanique.

ATTACHE PRINCIPAL : M. BERTHON
CONSERVATEUR de la BIBLIOTHEQUE : M. ARCHIMBAUD.

La Faculté décide que les opinions émises dans les travaux et mémoires présentées à l'occasion d'une soutenance de Thèse de Doctorat en Pharmacie doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner ni approbation, ni improbation. (Délibération du 6 Juin 1956).

A MES PARENTS

A MA SOEUR

A MA FAMILLE

A MES AMIS

AVANT-PROPOS

Le thème de recherches, qui nous fût initialement confié, concernait l'étude du couplage éventuel de l'Electrophorèse avec la Chromatographie sur échangeurs d'ions.

Un certain nombre de problèmes théoriques et techniques ne nous ont pas permis d'aboutir d'emblée à des résultats d'interprétation aisée. C'est pourquoi nous avons été amenés à entreprendre une étude systématique des phénomènes fondamentaux de l'Electrophorèse sur couches minces en utilisant des substrats relativement inertes, tels que la cellulose.

L'objet de nos recherches s'est donc limité à l'application de l'Electrophorèse sur couches minces à l'étude de la stabilité en solution de complexes simples, tels que les acides faibles polycarboxyliques, les acides aminés et certains complexes organo-métalliques.

Ce travail n'a été possible que grâce à la collaboration efficiente, qui existe depuis de nombreuses années entre les Laboratoires de Biophysique et de Chimie analytique de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Clermont-Ferrand et l'Unité n° 71 de l'I.N.S.E.R.M.

Nos remerciements iront en premier lieu à Monsieur le Doyen G. MEYNIEL, qui nous a accueilli dans son service et nous a chargé, pendant plusieurs années, des fonctions d'assistant. La confiance qu'il nous a accordée d'emblée et la bienveillance qu'il nous a toujours manifestée nous ont permis de poursuivre nos recherches et nous lui exprimons notre respectueuse gratitude.

C'est à Monsieur le Professeur J.A. BERGER que nous devons notre initiation au laboratoire. Il nous a proposé le sujet définitif de notre thèse de

Doctorat, qu'il a constamment dirigée et orientée jusqu'à son terme. Nous l'assurons de notre profond attachement et de notre vive reconnaissance.

Monsieur le Professeur J. DAUPHIN a bien voulu s'intéresser à nos recherches et nous faire bénéficier de sa très haute culture scientifique. Il a vérifié en particulier l'ensemble de nos démonstrations mathématiques et nous a suggéré des solutions intéressantes à des problèmes difficiles. Nous le remercions très sincèrement pour la cordialité de son accueil.

Nos remerciements iront également à Madame le Professeur G. GAIL-LARD, sous la direction de laquelle nous avons accompli nos années d'assistantat au Laboratoire de Physique, ainsi qu'à Madame le Professeur J. PETIT, dont les travaux en Chromatographie sur couches minces ont été, sur le plan technique, à la base de nos recherches.

Nous tenions tout spécialement à souligner l'efficace collaboration que nous ont apportée nos amis, MM. G. BESSE et J.L. CHABARD. Leur contribution à ce travail a été décisive et nous les assurons de notre reconnaissance et de notre fidèle amitié.

Nous associerons également dans une même pensée amicale tous les enseignants, chercheurs et techniciens des Laboratoires de Biophysique, de Chimie analytique et de l'Unité n° 71 de l'I.N.S.E.R.M., qui furent nos compagnons de travail pendant de longues années.

Nous exprimerons enfin notre respectueuse reconnaissance à tous nos Maîtres des Facultés de Médecine, de Pharmacie et de Sciences de Clermont-Ferrand.

INTRODUCTION

Etudiée depuis environ un siècle, la migration de substances chargées dans un champ électrique est désormais désignée sous le terme général d'électromigration, qui ne préjuge en rien de la nature de ces substances. Pour les ions relativement petits, Martin et Syngé (21) proposent d'utiliser plutôt le terme d'ionophorèse, celui d'électrophorèse s'appliquant plus couramment à l'électromigration de particules chargées de taille bien supérieure, telles que les protéines.

Lorsque l'électromigration s'effectue au sein d'une phase liquide homogène, on parle dans ce cas d'électrophorèse libre, par opposition à l'électrophorèse sur support, où la phase liquide est dispersée au sein d'une phase solide très finement divisée.

Enfin, depuis le développement des méthodes chromatographiques, l'électrophorèse sur support est désignée volontiers sous le terme d'électrochromatographie.

Il semble que la migration électrophorétique ait été décrite pour la première fois par Lodge (17) en 1886, à l'occasion d'expériences réalisées en vue de mesurer des vitesses ioniques ; utilisant dans ce but un milieu gélifié, il observe soit les variations de couleur d'un indicateur coloré pour les ions H^+ et HO^- , soit l'apparition d'un précipité pour des ions tels que Ba^{2+} et SO_4^{2-} . Ces premiers essais ont été suivis de recherches plus systématiques (7, 10, 22, 23, 25, 26), réalisées également en milieu gélifié. Abandonnant l'utilisation d'un support solide, Whetham semble être le premier à avoir abordé l'étude de la migration d'ions en phase liquide homogène, c'est-à-dire en solution libre. Il est évident qu'à l'origine, aucun de ces procédés n'était susceptible d'apporter de résultats précis et que l'appareillage utilisé était

trop rudimentaire, pour permettre une séparation véritable de substances migrant à des vitesses différentes. C'est pourtant dans ces conditions, que sont réalisées la plupart des études initiales sur la migration de colloïdes biologiques.

Dès 1910, Michaelis (23) effectue ainsi les premières déterminations des points isoélectriques de certains enzymes, mais leur pureté insuffisante, de même que la méconnaissance de leur nature chimique exacte, ne permettent pas d'attribuer à ces recherches une signification biologique très valable. Ce n'est que longtemps après, en 1924, que Kendall (12) propose une méthode analytique plus élaborée, fondée sur la migration électrophorétique au sein d'un gel d'agar, qui lui permet de séparer avec succès divers cations métalliques et en particulier des couples de terres rares. Il est d'ailleurs surprenant, que ce travail ait été complètement oublié pendant près de quarante ans et n'ait été repris que très récemment par d'autres chercheurs.

A cette époque, en effet, il semble que l'intérêt de la technique électrophorétique se soit surtout manifesté en vue de la séparation de protéines biologiques en milieu liquide, en utilisant la méthode de mesure réfractométrique, déjà adaptée par Svedberg à l'ultracentrifugation.

En 1931, Tiselius et collaborateurs (27) mettent au point la première méthode électrophorétique véritable. Cette technique ouvre la voie à un fractionnement de plus en plus poussé de substances considérées jusqu'alors comme homogènes, à la détermination précise de leurs points isoélectriques et à l'étude approfondie de certaines de leurs propriétés physicochimiques ou biologiques. C'est ainsi que, dans le cas des protéines, l'homogénéité électrophorétique peut être considérée désormais comme un critère de pureté. La technique de Tiselius a d'ailleurs permis l'isolement des premières fractions de protéines pures. Malheureusement, il s'agit d'une technique très délicate, dont l'utilisation a été limitée pendant longtemps à un petit nombre de laboratoires spécialisés. C'est probablement pourquoi König (13) a orienté ses recherches dans le domaine biologique, vers l'emploi de l'électrophorèse sur support ; il réalise ainsi la séparation des constituants de venin de serpent par électrophorèse sur papier filtre. Il faut remarquer que ces premières recherches ont été publiées en 1937, c'est-à-dire la même année où Tiselius mettait définitivement au point sa remarquable technique d'électrophorèse en phase liquide. Cette technique en effet devait soulever un intérêt

considérable et c'est probablement pour cette raison, que le travail de König passa à l'époque pratiquement inaperçu.

Parallèlement au développement des techniques électrophorétiques en milieu liquide, on assiste également à la redécouverte de la chromatographie, restée en sommeil depuis les premiers essais de Tswett vers 1903. A la suite des travaux fondamentaux de l'équipe américaine de Consden, Gordon et Martin (3), relatifs à la chromatographie de partage, l'électrophorèse sur papier se développe progressivement grâce à Wieland et Fisher (30) (acides aminés), à Durrum (6) (protéines), ainsi qu'à de nombreux autres chercheurs (1, 5, 8, 11, 14, 18, 20, 29).

Essentiellement orienté au départ vers les constituants biologiques, ce procédé s'étend rapidement à tous les produits ionisés. Depuis lors dans les domaines les plus variés, l'électrophorèse sur support connaît un essor extrêmement rapide et important, grâce à l'utilisation de substrats variés autres que le papier et au perfectionnement continu de l'appareillage ; elle s'étend maintenant à tous les domaines de l'analyse minérale, organique et biologique.

Il est intéressant d'ailleurs de signaler la reconversion rapide de Tiselius et collaborateurs à cette nouvelle technique, comme en témoigne un premier mémoire (28) publié en 1953, dans lequel de nombreuses applications de l'électrophorèse sur papier sont décrites tout en laissant entrevoir ses possibilités considérables.

L'engouement qu'elle suscita parmi les utilisateurs s'explique essentiellement par l'importance des renseignements d'ordre biologique, qu'elle est susceptible de fournir. On conçoit donc aisément, qu'elle ait pu être utilisée pendant longtemps, sans que des assises physiques solides aient été établies. En effet, en dépit des milliers de publications qui lui sont consacrées, on peut dire avec Peeters (24) que « probablement aucune méthode physicochimique n'a jamais été employée aussi largement, avec une connaissance si minime de ses principes fondamentaux ». Il faut en voir la raison essentielle dans la simplicité de sa mise en oeuvre expérimentale, qui rend inutile dans la plupart de ses applications toute théorie approfondie. Comme la chromatographie d'ailleurs, l'électrophorèse sur support et plus précisément l'électrophorèse sur papier sont utilisées en effet presque exclusivement en vue du fractionnement de mélanges complexes et de la détermination quantitative des constituants (2, 4, 9, 16, 24, 31). Le manque

d'études fondamentales précises, concernant la migration électrophorétique sur support, a ainsi longtemps retardé son éclosion comme méthode d'investigation physicochimique.

Par rapport à l'électrophorèse en milieu liquide, l'électrophorèse sur support présente pourtant un certain nombre d'avantages, qui sont d'ailleurs ceux de la chromatographie, microéchantillons, multiplication des essais, révélation et caractérisation plus facile des substances séparées. Par contre, la présence d'un support solide, dont l'inertie physicochimique n'est jamais totale, entraîne des modifications plus ou moins importantes dans le comportement de la plupart des composants ionisés, par rapport aux migrations observées en milieu liquide ; c'est ainsi, qu'un certain nombre de résultats expérimentaux présentent parfois, tout particulièrement en biologie clinique, certains caractères d'incertitude en raison des conditions expérimentales mal définies. La connaissance précise des bases physiques et physico-chimiques des processus électrophorétiques sur support apparaît donc indispensable. C'est pourquoi depuis les travaux de Kunkel et Tiselius (15) en 1951, quelques chercheurs se sont consacrés à ces problèmes et actuellement les bases fondamentales essentielles semblent suffisamment précises, pour permettre d'obtenir des données scientifiques valables à partir des mobilités électrophorétiques.

Nous résumerons dans les chapitres suivants les différentes études, qui concernent les facteurs influant sur la migration électrophorétique et en particulier le rôle du support solide. Tous les travaux examinés dans cette première partie ont été consacrés à l'électrophorèse sur papier. Le but de notre travail a été de reprendre l'essentiel de ces recherches, en vue de leurs applications à l'électrophorèse sur couches minces. La deuxième partie sera donc consacrée à l'étude des divers paramètres expérimentaux, permettant d'utiliser cette technique comme méthode d'investigation de la stabilité des complexes en solution, fondée sur la mesure des mobilités électrophorétiques.

BIBLIOGRAPHIE (I)

- 1 - BISERTE E., *Biochim. Biophys. Acta*, 1950, 4, 416.
- 2 - BLOCK R.J., DURRUM E.L. et ZWEIG G., « *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis* », 2ème Ed., Academic Press New York, 1958.
- 3 - CONSDEN R., GORDON A.H., et MARTIN A.J.P., *Biochem. J.*, 1944, 38, 224.
- 4 - COOPER G.R., « *The Plasma Proteins* », Vol. I, Putnam F.W. (Ed.), Academic Press New York, 1960.
- 5 - CREMER G.R. et TISELIUS A., *Biochem. Z.*, 1950, 320, 273.
- 6 - DURRUM E.L., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1950, 72, 2943.
- 7 - FIELD C.W. et TEAGUE O., *J. Exptl. Med.*, 1907, 9, 86 et 1907, 9, 222.
- 8 - GRASSMAN W. et HANNIG K., *Naturwissenschaften*, 1950, 37, 496.
- 9 - HANNIG K., « *Handbuch der Physiologisch-pathologisch-chemischen Analyse* », ds Hoppe-Seyler et Thierfelder, 10ème Ed., Springer Verlag Berlin, 1958.
- 10 - HARDY W.B., *J. Physiol. (London)*, 1899, 24, 288 et 1905, 33, 251.
- 11 - HAUGARD G. et KRONER T.D., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1948, 70, 2135; Brevet américain 25554287, 27 Fevr. 1948.
- 12 - KENDALL J. et WHITE J.F., *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.*, 1924, 10, 458.
- 13 - KÖNIG P., *Actas Trabal.*, 3ème Congr. Sul. Amer. Chim., 1937, 2, 334.
- 14 - KRAUS K. et SMITH G., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1950, 72, 4329.
- 15 - KUNKEL H.G. et TISELIUS A., *J. Gen. Physiol.*, 1951, 35, 89.
- 16 - LEDERER M., « *An Introduction to Paper Electrophoresis and Related Methods* » 2ème Ed. Elsevier Amsterdam, 1958.
- 17 - LODGE O., *Brit. Assoc. Reports*, 1886, p. 36.
- 18 - MAC DONALD H., URBIN M. et WILLIAMSON H., *Science*, 1950, 112, 227.
- 19 - MACHEBOEUF M., DUBERT J.M. et REBEYROTTE P., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1953, 35, 346.
- 20 - MACHEBOEUF M., REBEYROTTE P., DUBERT J.M. et BRUNERIE M., *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1953, 35, 334.

- 21 - MARTIN A.J.P. et SYNGE R.L.M., Adv. in Protein Chem., 1945, (II).
 - 22 - MASSON O., Phil. Trans. Roy. Soc. (London), 1899, A 192, 331.
 - 23 - MICHAELIS L., Biochem. Z., 1909, 16, 81.
 - 24 - PEETERS H., Adv. Clin. Chem., 1959, 2, 1.
 - 25 - PICTON H. et LINDER S.E., J. Chem. Soc., 1892, 61, 142 et 1897, 71
568
 - 26 - TEAGUE O., et BUXTON B.H., J. Exptl. Med., 1907, 9, 254.
 - 27 - TISELIUS A., Nova Acta Regiae Soc. Sci. Upsaliensis, 1931, (4) 7, 4.
 - 28 - TISELIUS A. et FLODIN P., Adv. in Protein Chem., 1953, VIII, 461.
 - 29 - TURBA F. et ENENKEL H., Naturwissenschaften, 1950, 37, 93.
 - 30 - WIELAND J. et FISHER E., Naturwissenschaften, 1948, 35, 29.
 - 31 - WUNDERLY C., « Electrophoresis », Bier M. (Ed.), Academic Press
New-York, 1959.
-

PREMIERE PARTIE

« BIBLIOGRAPHIE »



Données théoriques et techniques
relatives à l'Electrophorèse sur support.

CHAPITRE I

PARAMETRES IONIQUES OU MOLECULAIRES.

Dans une étude récente, Kowalczyk (12) considère essentiellement le déplacement électrophorétique comme le mouvement d'une particule chargée dans un fluide. Cette particule est soumise d'une part à une force de migration exercée par le champ électrique et d'autre part à une force de résistance, due au fluide qui l'entoure. L'analyse mathématique de cette migration aboutit à l'expression d'une vitesse ionique, qui est une fonction exponentielle du temps. Néanmoins, la constante de temps du processus étant de l'ordre de 10^{-14} (1), on peut considérer pratiquement qu'un ion A atteint instantanément sa vitesse limite v_A , définie par l'expression :

$$v_A = \frac{Q_A \cdot E}{k} \quad (I)$$

dans laquelle Q_A représente la charge de l'ion A, E le champ électrique, k étant une constante qui dépend de la nature de la particule et de la viscosité du fluide, dans lequel s'effectue la migration. Dans un champ électrique donné E, chaque ion se déplace donc avec une vitesse constante qui lui est propre.

On désigne par mobilité u_A d'un ion donné A, sa vitesse de déplacement dans un champ électrique unité (1 volt/cm), selon l'expression :

$$u_A = \frac{v_A}{E} = \frac{Q_A}{k} \quad (II)$$

Les travaux de Stokes (19) ont permis de définir la constante k avec plus de précision. Pour une particule sphérique de rayon r_A (en $\text{\AA}$), se déplaçant à la vitesse v_A , dans un milieu de viscosité η , la force de résistance peut être donnée par l'expression :

$$F_r = 6 \pi \eta r_A v_A \quad (\text{III})$$

Des expressions (I) et (III) on déduit que :

$$k = 6 \pi \eta r_A$$

Des études complémentaires, effectuées récemment (3, 5, 10, 11, 13, 15, 21), ont permis d'appliquer l'équation de Stokes à des particules de très faibles dimensions, molécules ou ions. Elles montrent en particulier, que le facteur numérique 6 doit être abaissé dans d'assez fortes proportions (5 ou 4), si la taille des sphères ioniques devient très petite. D'autre part, un ion n'est pas systématiquement assimilable à une particule sphérique et dans ce cas, il convient de tenir compte de sa forme. C'est pourquoi a été proposée l'introduction d'un autre paramètre, appelé coefficient de frottement (f/f_o), que nous préciserons par la suite. Compte tenu de ces considérations et si l'on exprime par x le facteur numérique variable, l'équation de Stokes peut alors s'écrire :

$$F_r = x \pi \eta r_A v_A (f/f_o) \quad (\text{IV})$$

avec :

$$k = x \pi \eta r_A (f/f_o) \quad (\text{V})$$

Résultant des équations (II) et (V), l'expression de la mobilité ionique peut s'écrire :

$$u_A = \frac{Q_A}{k} = \frac{z_A \cdot e}{x \pi \eta r_A (f/f_o)} \quad (\text{VI})$$

dans laquelle z_A représente la valence de l'ion, e la charge élémentaire, les autres termes de l'expression ayant déjà été définis précédemment. La mobilité d'un ion serait donc essentiellement fonction de sa valence z_A , de sa

TAB L E A U I

EXEMPLE DE CALCUL DE MOBILITE A PARTIR DE L'EQUATION (VI)

Supposons qu'il s'agisse d'ions sphériques, de valence $z_A = 1$ et de rayon $r_A = 20 \text{ \AA}$. En utilisant d'une part le système C.G.S. et d'autre part le système M.K.S.A., il est possible de calculer leur mobilité en solution aqueuse à 25° C .

Nous prendrons $x = 4$ et $f/f_0 = 1$.

Les résultats obtenus, parfaitement identiques dans les deux systèmes, correspondent évidemment à des valeurs arbitraires, choisies pour les divers paramètres.

Système C.G.S.	Système M.K.S.A.
$u_A = \frac{z_A e}{x\pi\eta r_A (f/f_0)}$ $e = 1,6 \cdot 10^{-19} \text{ Coulomb}$ $\eta = 1 \text{ centipoise} = 10^{-2} \text{ poise}$ $r_A = 20 \text{ \AA} = 2 \cdot 10^{-7} \text{ cm.}$ $u_A = \frac{4,8 \cdot 10^{-10}}{4\pi \cdot 10^{-2} \cdot 2 \cdot 10^{-7}} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot (\text{U.E.S.C.G.S.})^{-1}$ $= 0,19 \cdot 10^{-1} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot (\text{U.E.S.C.G.S.})^{-1}$ Si $E = 10 \text{ volts} \cdot \text{cm}^{-1} = 1/30 (\text{U.E.S.C.G.S.}) \cdot \text{cm}^{-1}$ $v_A = u_A \cdot E = \frac{0,19 \cdot 10^{-1} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}}{30} = 6,3 \cdot 10^{-4} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ Soit : $v_A = 2,3 \text{ cm/h}$	$e = 1,6 \cdot 10^{19} \text{ Coulomb}$ $\eta = 1 \text{ centipoise} = 10^{-3} \text{ décapoise}$ $r_A = 20 \text{ \AA} = 2 \cdot 10^{-9} \text{ m.}$ $u_A = \frac{1,6 \cdot 10^{-19}}{4\pi \cdot 10^{-3} \cdot 2 \cdot 10^{-9}} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{volt}^{-1}$ $= 6,3 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{volt}^{-1}$ Si $E = 10 \text{ volts} \cdot \text{cm}^{-1} = 10^3 \text{ volts} \cdot \text{m}^{-1}$ $v_A = u_A \cdot E = 6,3 \cdot 10^{-6} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1} = 6,3 \cdot 10^{-4} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ Soit : $v_A = 2,3 \text{ cm/h}$

taille r_A et de sa forme, exprimée par (f/f_0) . Liés à la nature même de l'ion, ces trois paramètres sont dits moléculaires ou ioniques. On connaît en général la charge d'un ion simple, mais pour le calcul des mobilités théoriques à partir de l'équation (VI), certaines précisions doivent être apportées en ce qui concerne les paramètres, r_A et (f/f_0) .

I - Taille des ions.

Edward (2) calcule le volume de Van der Waals d'un ion organique, par addition des divers incréments correspondant à chacun de ses atomes constitutifs ; Elworthy (8) utilise une autre méthode fondée sur des mesures de conductivité ionique ; d'autres auteurs (16, 18) obtiennent les volumes ioniques, en divisant les volumes molaires ou les volumes molaires partiels, par le nombre d'Avogadro. Dans ce dernier cas, il faut admettre qu'une partie de ces volumes calculés représente des volumes libres ou vides. Aussi, semble-t-il plus logique de considérer le volume réel de la particule migrante (8) et en fait cette hypothèse conduit à des calculs simples, qui paraissent parfaitement valables.

II - Forme des ions.

La résistance de frottement au passage d'un ion à travers un fluide est évidemment fonction de sa forme. L'étude des modèles atomiques a montré que beaucoup d'ions pouvaient être considérés comme des sphères ou des ellipsoïdes allongées ou aplaties. Lorsqu'il s'agit d'ellipsoïdes, qui représentent le cas le plus complexe, le coefficient de frottement (f/f_0) , alors introduit dans l'équation (IV), est défini comme le rapport de la résistance de frottement f , due au passage d'une ellipsoïde à travers un liquide, à la résistance f_0 qu'offrirait dans les mêmes conditions une sphère de volume identique. Perrin (15) a proposé des équations, reliant la résistance de frottement au rapport b/a des demi-axes a et b d'une ellipsoïde aplatie ou allongée. Elworthy (8, 14) a étudié une autre méthode pour obtenir f/f_0 et a généralisé les calculs de Perrin au cas d'ellipsoïdes, possédant 3 demi-axes inégaux a , b et c .

Pour vérifier ces données théoriques, Edward et Elworthy ont tenté de mesurer expérimentalement les mobilités de divers ions. Les travaux d'Edward et collaborateurs (6, 7) ont porté sur des ions ammonium substitués,

des ions carboxylate, des acides aminés et certains ions organiques simples, tels que les ions dérivés de la n-butylamine, de la m-nitroaniline, de l'acide picrique et du p-nitrophénol.

De son côté, Elworthy (8) a étudié d'une part l'ion benzoate et d'autre part des anions relativement volumineux.

Une correspondance satisfaisante entre les mobilités calculées à partir de l'équation (VI) et les mobilités expérimentales n'a été enregistrée que dans quelques cas seulement. Edward a tenté d'expliquer les écarts constatés et a émis les restrictions suivantes, en ce qui concerne la validité de l'équation (VI).

III - Corrections des mobilités.

1 - Nature du solvant: corrections à apporter pour les solvants non aqueux.

2 - Solvation : dans un solvant polaire tel que l'eau, un ion subit toujours une solvation partielle ou totale, qui tend à augmenter son rayon ionique, dont la détermination précise reste très difficile.

En outre, l'importance de cette solvation varie dans d'assez grandes proportions, selon la taille et la charge des ions. Des ions monovalents de petites dimensions, tels que Rb^+ , Cs^+ , Cl^- , I^- et même les ions formiate et acétate, engendrent un champ électrique très intense, qui aurait pour résultat la diminution apparente de leur degré d'hydratation. Leurs mobilités mesurées apparaissent ainsi plus élevées que la théorie ne le laisse prévoir (4, 9, 11, 20). Le même phénomène peut se produire pour des ions de dimensions supérieures, mais de charge plus élevée.

Il semble que l'influence des groupements polaires se manifeste également dans le même sens, pour des ions organiques de dimensions suffisamment petites. Dans le cas des amides, des études de viscosité (17) n'ont montré une diminution apparente du degré d'hydratation que pour des molécules de petite taille comme le formamide ou l'acétamide.

L'influence des groupements polaires a également été enregistrée sur des ions organiques, qui en contiennent un nombre suffisant ; il apparaît que la présence de plusieurs groupements hydroxyles, sur une molécule organique à groupement carboxylate, augmenterait son hydratation dans des proportions suffisantes, pour entraîner une diminution notable de sa mobilité.

3 - *Forme des ions* : les mobilités d'ions très irréguliers s'avèrent difficiles à calculer, en raison de la méconnaissance de la valeur du coefficient f/f_0 ; c'est ainsi que l'ion tétrapropylammonium, en forme de « bouton », migre beaucoup plus lentement que les ions sphériques de volume équivalent.

4 - *Volume de l'ion* : pour des ions de volume important, tels que les nucléotides, il est difficile d'obtenir des coefficients de frottement valables. L'assimilation à des sphères ou à des ellipsoïdes n'est possible que pour des ions organiques de faibles dimensions, à chaînes relativement courtes. Pour des chaînes plus longues et plus ramifiées, les ions correspondants semblent s'écarter assez nettement de la forme sphérique ou ellipsoïdale.

En conclusion, l'équation (VI), dérivée de la relation de Stokes, ne semble s'appliquer qu'aux ions organiques simples. Pour des ions complexes, il paraît nécessaire de formuler un certain nombre d'hypothèses complémentaires. Cette relation semble donc insuffisante pour calculer de façon précise les mobilités électrophorétiques, mais elle a le mérite, par sa simplicité, de mettre en évidence l'influence de certains paramètres fondamentaux, tels que la charge, la taille et la forme des ions étudiés.

BIBLIOGRAPHIE (II)

Certaines références bibliographiques sont mentionnées dans le texte sous forme d'un chiffre arabe, suivi d'un chiffre romain, par exemple 6-V, 4-II, 1-VI, etc ... ; il s'agit de travaux déjà cités dans un chapitre précédent. Dans ce cas :

- le chiffre I correspond à l'introduction.
 - les chiffres II à VII correspondent respectivement aux chapitres I à VI.
-

- 1 - AUDUBERT R. et DE MENDE S., « Les Principes de l'électrophorèse », Presses Universitaires de France, 1957, p 35 et 88 à 90.
- 2 - EDWARD J.T., Chem. and Ind. London, 1956, p 774.
- 3 - EDWARD J.T., Chem. and Ind. London, 1956, p 929 ; Sci. Proc. Roy. Soc., 1956, 27, 273.
- 4 - EDWARD J.T., Res. Correspondence, 1956, 9A_I.
- 5 - EDWARD J.T., J. Polymer. Sci., 1957, 25, 483.
- 6 - EDWARD J.T. et WALDRON—EDWARD D., J. Chromatog., 1965, 20, 563.
- 7 - EDWARD J.T. et WALDRON—EDWARD D., J. Chromatog., 1966, 24, 125.
- 8 - ELWORTHY P.H., J. Chem. Soc., 1962, p 3718.
- 9 - FEATES F.S. et IVES D.J.G., J. Chem. Soc., 1956, p 2798.
- 10 - GLASSTONE S., LAIDLER K.J. et EYRING H., « The Theory of Rate Processes » Mc. Graw Hill New-York, 1941, p 519 et 552.
- 11 - GURNEY R.W., « Ionic Processes in Solution », Mc. Graw Hill New-York 1953, p 51, 66 à 71 et 169 à 171.
- 12 - KOWALCZYK J., Chem. Anal. (Warsaw), 1964, p 899.
- 13 - LI J.C.M. et CHANG P., J. Chem. Phys., 1955, 23, 518.
- 14 - PAULING L., « Nature of the Chemical Bond », 2ème Ed. Cornell Univ. Press Ithaca N.Y., p 79, 160 et 187.
- 15 - PERRIN F., J. Phys. Radium, 1936, 7 (VII), I ;

- COHN E.J. et EDSALL J.T., «Proteins, Amino-acides and Peptides», Reinhold New-York, 1943, p 406.
- 16 - ROBINSON R.A. et STOKES R.H., «Electrolyte Solutions», 2ème Ed. Butterworths, London, 1959, p 104, 124, 142, 463 et 465.
- 17 - RUPLEY J.A., J. Phys. Chem., 1964, 68, 2002.
- 18 - SPIVEY H.O. et SNELL F.M., J. Phys. Chem., 1964, 68, 2126.
- 19 - STOKES G.G., Trans. Cambridge Phil. Soc., 1856, 9, 5.
- 20 - WANG J.H., J. Phys. Chem., 1954, 58, 686.
- 21 - WEIDEL W. et KELLENBERGER E., Biochim. Biophys. Acta, 1955, 17, 1.
-

CHAPITRE II

PARAMETRES LIBRES.

La migration électrophorétique d'une particule chargée dépend tout d'abord, nous l'avons vu au chapitre précédent, de ses dimensions et de sa structure chimique.

L'influence du milieu, dans lequel s'effectue cette migration, est également prépondérante. La nature et les caractères physico-chimiques de la solution électrolytique d'une part et du milieu support d'autre part doivent être soigneusement étudiés et précisés. Ils constituent ce que l'on désigne couramment sous le terme de « paramètres expérimentaux ».

Dans ce chapitre, nous envisagerons l'influence de l'électrolyte tampon (nature, pH, concentration) et de la température, désignés par Waldmann-Meyer (12) sous le terme de « paramètres libres ».

La diminution de l'activité ionique d'une solution d'électrolyte en fonction de la concentration, qui se traduit en particulier par la diminution de sa conductivité équivalente, a été attribuée par Debye et Hückel (3) à des interactions de type coulombien entre les différents ions qui la composent. En effet, dans une solution électrolytique, un ion donné a tendance à repousser les ions de même signe et à attirer les ions de signe opposé. Par contre, l'agitation thermique a tendance à s'opposer à la condensation des ions. Il résulte de ces deux phénomènes la formation, autour de l'ion central, d'une véritable atmosphère ionique, appelée « couche double électrique », dont l'étude quantitative est extrêmement délicate.

Nous nous contenterons, dans cet exposé, d'en préciser les aspects les plus utiles à l'étude des processus électrophorétiques, en rappelant brièvement la théorie originale de Gouy (5) et Chapman (2), ainsi que les précisions

complémentaires apportées par Stern (11). Pour des renseignements plus détaillés, nous renvoyons le lecteur aux ouvrages de Falkenhagen (4) et Shaw (9).

I - Théorie de la couche double électrique de Gouy et Chapman.

L'étude de la distribution des ions d'une solution électrolytique, mise en contact avec une paroi chargée, de même que l'étude de la variation du potentiel électrique V , en fonction de la distance x à cette paroi, ont amené Gouy et Chapman à émettre les hypothèses suivantes :

- la paroi est supposée plane, uniformément chargée et portée à un certain potentiel V_o ,
- l'électrolyte de concentration C_o , exprimée en moles/cm³, est supposé complètement dissocié en deux ions monovalents.

Partant de l'équation de Poisson et se basant sur le principe de Boltzmann, ils ont abouti à l'équation :

$$V = V_o \cdot e^{-Kx} \quad (I)$$

Il s'agit en fait d'une équation approchée, dérivant d'une expression plus complexe et pour l'établissement de laquelle, le rapport des énergies mises en jeu (électrique d'une part et thermique d'autre part) est supposé petit. Le facteur K peut s'exprimer par la formule :

$$K = F \cdot \left[\frac{2 C_o}{\epsilon_o DRT} \right]^{\frac{1}{2}} \quad (II)$$

où F représente le Faraday, D la constante diélectrique du milieu considéré, R la constante des gaz parfaits, T la température absolue, et ϵ_o la permittivité du vide. Le potentiel V_o peut être relié d'autre part à la densité superficielle de charge σ_o de la paroi, si l'on admet l'égalité entre la charge à la surface de la paroi et la charge réelle de la couche double électrique ; en appliquant la distribution de Poisson-Boltzmann et pour des potentiels peu élevés, la relation finale s'écrit :

$$V_o = \frac{\sigma_o}{\epsilon_o DK} \quad (\text{III})$$

Dans cette équation, la valeur $1/K$ peut être assimilée à l'épaisseur d'un condensateur plan, présentant une différence de potentiel V_o entre ses armatures, portant les charges $+\sigma_o$ et $-\sigma_o$. Elle désigne habituellement l'épaisseur de la couche double électrique.

Dans le cas général d'un mélange d'électrolytes, donnant naissance à des ions diversement chargés, le facteur K s'écrit :

$$K = F \left[\frac{\sum c_i z_i^2}{\epsilon_o DRT} \right]^{\frac{1}{2}} \quad (\text{IV})$$

où c_i correspond à la concentration en moles par cm^3 de l'ion i , caractérisé par la valence z_i .

On utilise plus couramment la notion de force ionique μ , proposée par Lewis et qui s'exprime par la relation :

$$\mu = \frac{1}{2} \cdot \sum c_i z_i^2 \quad (\text{V})$$

où c_i représente alors la concentration de chaque espèce ionique, exprimée en moles par litre et non par cm^3 , comme dans l'équation (IV).

Bien qu'incomplète et relativement imprécise, cette première théorie de la couche double électrique a néanmoins le mérite de mettre en évidence les principaux facteurs, qui interviennent au cours des phénomènes étudiés.

II - Précisions apportées par Stern à la théorie initiale de Gouy et Chapman.

L'hypothèse émise par Gouy et Chapman, pour l'établissement de l'équation (I), n'est plus valable pour des régions très proches de la surface

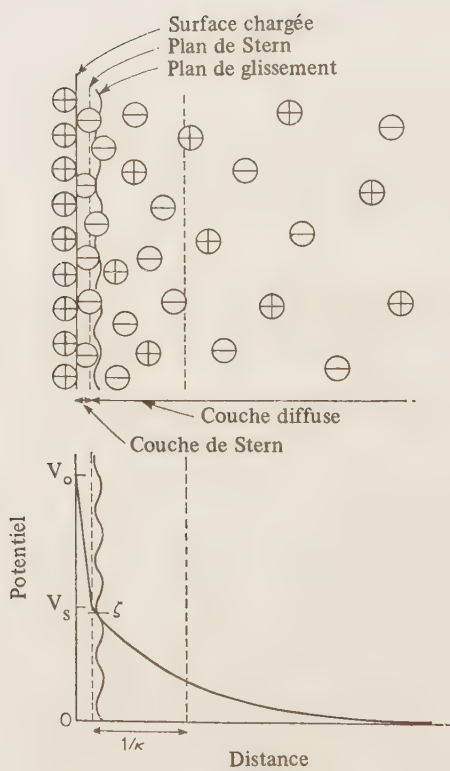


FIGURE 1

Schéma de couche double électrique

chargée, où le potentiel est relativement élevé. En outre, assimilés jusqu'à présent à des charges ponctuelles au sein du milieu électrolytique, les ions doivent être plutôt considérés, en raison de leur hydratation, comme ayant des dimensions finies. C'est pourquoi Stern (11) a été amené à diviser la couche double électrique en deux parties séparées par un plan (plan de Stern), dont la distance à la surface chargée serait égale à environ un rayon ionique hydraté.

Dans la partie interne ou couche de Stern, se situeraient tous les centres des ions adsorbés spécifiquement par la surface chargée ; dans cette zone, le potentiel décroît de V_o (potentiel de paroi) à V_s (potentiel de Stern), à une vitesse supérieure à celle correspondant à la décroissance exponentielle (voir figure I ci-dessous). Dans la partie externe, ou couche diffuse, le potentiel décroît exponentiellement de V_s à 0 et les conclusions de Gouy et Chapman demeurent applicables.

Si une adsorption spécifique se produit, c'est généralement l'adsorption d'ions de signe contraire qui prédomine et une couche double typique peut être représentée selon la figure 1.

Il faut bien reconnaître cependant, que le modèle de Stern ne représente qu'un schéma approximatif d'une répartition beaucoup plus complexe. Néanmoins, ce modèle constitue déjà une base acceptable pour l'interprétation semi-quantitative de la plupart des observations expérimentales.

La théorie précédente, mise au point pour des surfaces chargées planes, peut être transposée à des surfaces sphériques. Les expressions obtenues sont en général plus complexes, mais les raisonnements et les calculs sont sensiblement les mêmes. Aussi cette théorie reste-t-elle applicable à des ions de types variés, bien que pour les plus volumineux d'entre eux les charges soient localisées souvent en des sites bien séparés.

III - Mobilité électrophorétique et potentiel électrocinétique.

Au cours de l'électrophorèse et en particulier en ce qui concerne le phénomène d'électro-osmose, qui sera étudié plus loin, le potentiel à considérer n'est plus le potentiel de surface V_o , mais un potentiel électrocinétique pouvant être défini comme le potentiel existant au plan de glissement (« Shear plane ») entre la surface chargée et la solution électrolytique. La localisation exacte de ce plan de glissement est difficile à préciser, bien qu'il paraisse raisonnable

de supposer qu'il ne coïncide pas exactement avec le plan de Stern ; il serait vraisemblablement un peu plus éloigné de la surface chargée que le plan de Stern, en raison des phénomènes d'adsorption ionique ou d'hydratation. Pour une particule donnée, le potentiel ζ peut être assimilé au potentiel existant au plan de glissement et résultant de la charge réelle $+Q_A$ à la surface de la particule (unité électrocinétique ou «électrokinetic unit») et de la charge $-Q_A$ correspondant à la particule diffuse de la couche double :

$$\zeta = \frac{Q_A}{\epsilon_o D r_A} - \frac{Q_A}{\epsilon_o D (r_A + 1/K)} = \frac{Q_A}{\epsilon_o D r_A (1 + K r_A)} \quad (\text{VI})$$

En utilisant des relations, qui dérivent de la loi de Stokes, certains auteurs ont pu exprimer la mobilité électrophorétique en fonction du potentiel électrocinétique. On a l'équation fondamentale :

$$u_A = \frac{\epsilon_o D \zeta}{A \pi \eta} \quad (\text{VII})$$

où A représente un facteur numérique variable selon les particules considérées. Pour des particules sphériques de dimensions moyennes, Hückel (8) a proposé la valeur $A = 6$; pour des particules de forme quelconque, mais de grandes dimensions par rapport à l'épaisseur de la couche double électrique, Smoluchowski (10) a retenu la valeur $A = 4$. Enfin, Henry (7) a proposé une relation plus générale en prenant $A = 6$ et en multipliant le numérateur de l'équation (VII) par le facteur $[1 + \lambda F (K r_A)]$, dans lequel $K r_A$ correspond au rapport du rayon effectif de la particule à l'épaisseur de la couche double électrique. La fonction $F (K r_A)$ varie de zéro à 1, lorsque la valeur de $K r_A$ augmente. Le paramètre λ est un facteur de correction des conductivités, intervenant lorsque la particule est de grandes dimensions, tout en gardant une conductance non négligeable.

Il est bien évident que ces relations ne font apparaître que les facteurs électrophorétiques essentiels, mais que d'autres phénomènes secondaires peuvent souvent modifier les mobilités. Par exemple, les ions de signe opposé,

situés dans l'atmosphère ionique entourant l'ion central, tendent à se déplacer en sens inverse, entraînant ainsi dans leur mouvement des molécules du solvant ; il s'ensuit, sur la migration de l'ion considéré, un effet de freinage appelé effet électrophorétique (ou effet cataphorétique).

De plus, lors de son déplacement, l'ion sort partiellement de l'atmosphère ionique, qui a tendance alors à se reformer autour de sa nouvelle position. Tout se passe comme s'il demeurait, à l'arrière de l'ion central en mouvement, un excès d'ions de signe opposé et que, devant lui par contre, la quantité de ces ions de signe opposé diminuait. L'asymétrie de l'atmosphère ionique ainsi obtenue engendre un champ électrique propre, qui s'oppose au champ électrique appliqué. Il s'ensuit donc un ralentissement de la migration de l'ion central, appelé couramment «effet de relaxation» ou «effet d'asymétrie», dont l'étude quantitative est très délicate. Aussi n'en tient-on pas compte en général, mais par contre, l'effet électrophorétique est souvent pris en considération pour l'établissement des équations de mobilités (6).

TABLEAU II

EXEMPLES DE CALCULS A PARTIR DES EQUATIONS PROPOSEES

Soit un électrolyte complètement dissocié en deux ions monovalents et dissous dans l'eau à la concentration de 10^{-1} M et à la température de 25° C. En utilisant d'une part le système C.G.S. et d'autre part le système M.K.S.A., il est possible de calculer l'épaisseur de la couche double électrique ($1 / K$), le potentiel électrocinétique correspondant, ainsi que la mobilité d'un des ions monovalents en solution.

Les résultats obtenus, parfaitement identiques dans les deux systèmes, correspondent évidemment à des valeurs arbitraires choisies pour les divers paramètres.

TABEAU II

Système C.G.S.	Système M.K.S.A.
A) Calcul de l'épaisseur de la couche double.	
$\frac{1}{K} = \frac{1}{F} \left[\frac{\epsilon_o D R T}{2 C_o} \right]^{\frac{1}{2}}$	
$\epsilon_o = 1/4 \pi$	$\epsilon_o = \frac{1}{36 \pi \cdot 10^9}$
D = 80	D = 80
F = 96500 coulombs	F = 96500 coulombs
= 96500 . 3 . 10 ⁹ U.E.S.C.G.S.	
R = 8,32 . 10 ⁷ ergs/ (°) (mole)	R = 8,32 joules/ (°) (mole)
T = 300° K.	T = 300° K.
C _o = 10 ⁻¹ M = 10 ⁻⁴ ions / cm ³	C _o = 10 ⁻¹ M = 10 ² ions / m ³
1 / K = $\frac{8,32 \cdot 10^7 \cdot 80 \cdot 300}{96500 \cdot 3 \cdot 10^9 \cdot 8 \pi \cdot 10^{-4}}$ cm	1 / K = $\frac{80 \cdot 10^{-9} \cdot 8,32 \cdot 300}{96500 \cdot 36 \pi \cdot 2 \cdot 10^2}$ m
Soit 1 / K = 10 ⁻⁷ cm = 10 Å	Soit 1 / K = 10 ⁻⁹ m = 10 Å

Système C.G.S.	Système M.K.S.A.
B) <u>Calcul du potentiel électrocinétique</u> $\zeta = \frac{Q_A}{\epsilon_o \cdot D \cdot r_A \cdot (1 + K \cdot r_A)}$	
$Q_A = 1,6 \cdot 10^{19} \cdot 3 \cdot 10^9 \text{ U.E.S.C.G.S.}$ $\epsilon_o = 1 / 4 \pi$ $D = 80$ $r_A = 20 \text{ \AA} = 2 \cdot 10^{-7} \text{ cm}$ $\zeta = \frac{4 \pi \cdot 4,8 \cdot 10^{-10}}{80 \cdot 2 \cdot 10^{-7}} \text{ U.E.S.C.G.S.}$ $= 12,5 \cdot 10^{-5} \text{ U.E.S.C.G.S.}$ $= 37,5 \cdot 10^{-3} \text{ volt} = 37,5 \text{ millivolts.}$	$Q_A = 1,6 \cdot 10^{-19} \text{ Coulomb}$ $\epsilon_o = \frac{1}{36 \pi \cdot 10^9}$ $D = 80$ $r_A = 20 \text{ \AA} = 2 \cdot 10^{-9} \text{ m}$ $\zeta = \frac{1,6 \cdot 10^{-19} \cdot 36 \pi}{80 \cdot 10^9 \cdot 2 \cdot 10^{-9} \cdot 3} \text{ volt}$ $= 37,5 \text{ millivolts.}$

Système C.G.S.	Système M.K.S.A.
C) Calcul de la mobilité	
	$u_A = \frac{\zeta \cdot D \cdot \epsilon_o}{6\pi \cdot \eta}$
$\epsilon_o = 1/4 \pi$	$\epsilon_o = \frac{1}{36 \pi \cdot 10^9}$
D = 80	D = 80
$\zeta = 37,5$ millivolts $= 12,5 \cdot 10^{-5}$ U.E.S.C.G.S.	$\zeta = 37,5$ millivolts $= 37,5 \cdot 10^{-3}$ volts $\eta = 1$ centipoise = 10^{-3} décapoise
$u_A = \frac{80 \cdot 12,5 \cdot 10^{-5}}{6 \pi \cdot 4 \pi \cdot 10^{-2}} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot (\text{U.E.S.C.G.S.})^{-1}$	$u_A = \frac{80 \cdot 10^{-9} \cdot 37,5 \cdot 10^{-3}}{36 \cdot 6 \cdot 10^{-3}} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{volt}^{-1}$
$= 4,22 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot (\text{U.E.S.C.G.S.})^{-1}$	$= 0,14 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{volt}^{-1}$
Si E = 10 volts/cm	$= 0,14 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{volt}^{-1}$
$v_A = u_A \cdot E = 4,22 \cdot 10^{-3} \cdot 1/30 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ soit $v_A = 0,5 \text{ cm/h}$	Si E = 10 volts/cm $v_A = u_A \cdot E = 0,14 \cdot 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ soit $v_A = 0,5 \text{ cm/h}$

IV - Conclusion : influence des différents paramètres sur les mobilités.

Toutes les équations exprimant les mobilités, telles que :

$$u_A = \frac{\epsilon_o D \zeta}{A \pi \eta} \quad (\text{VII})$$

font intervenir le facteur K, qui a pour valeur :

$$K = F \left[\frac{\sum c_i z_i^2}{\epsilon_o D R T} \right]^{\frac{1}{2}} \quad (\text{IV})$$

par l'intermédiaire du potentiel ζ qui s'écrit :

$$\zeta = \frac{Q_A}{\epsilon_o D \cdot r_A (1 + K r_A)} \quad (\text{VI})$$

Dans ce facteur K apparaissent la force ionique, la température et la constante diélectrique du milieu, qui entoure l'ion considéré.

1 - Influence de la température.

La température agit essentiellement sur la mobilité ionique, par l'intermédiaire de la viscosité. En effet, son influence sur la constante diélectrique est certaine, mais lorsqu'elle augmente, la constante diélectrique tend à diminuer, ce qui fait que $\sqrt{DT}$ varie très peu. Si, par exemple, la température de l'eau passe de 0° C à 20° C, la viscosité diminue et passe de 1,79 à 1 centipoise,

tandis que la valeur de $\sqrt{DT}$ ne diminue que de 15,5 à 15,3 (1). Grâce à la relation établie par Tiselius, il est toujours possible de corriger les mobilités en fonction de la température, selon l'équation :

$$(\text{à la température } T_1) \quad \eta_1 u_1 = \eta_2 u_2 \quad (\text{à la température } T_2)$$

2 - Influence de la nature, du pH et de la concentration de l'électrolyte tampon.

Il ressort également des relations précédentes, que les variations de la mobilité u_A sont inversement proportionnelles à la racine carrée de la force ionique. Par ailleurs, la nature de l'électrolyte tampon peut entraîner des modifications spécifiques de la charge électrique de la particule étudiée, en raison des interactions entre ses propres sites chargés et les ions de l'électrolyte. Ce phénomène, qui est d'une importance capitale, doit être considérée avec soin dans le choix de l'électrolyte tampon idéal. Il en est précisément ainsi, lorsque l'électrolyte tampon est susceptible de complexer les ions, dont on étudie la migration électrophorétique. Intervenant d'autre part dans la dissociation de certains électrolytes faibles, le pH du tampon peut modifier de façon importante la valeur de la force ionique du milieu et éventuellement la charge proprement dite de l'ion étudié.

Si, comme nous l'avons vu au chapitre précédent, la mobilité d'un ion ou d'une particule chargée est essentiellement fonction de sa nature propre (paramètres ioniques ou moléculaires), on voit néanmoins que l'influence de l'électrolyte tampon reste fondamentale. Il s'ensuit que, dans toute étude expérimentale, doivent être précisés tous les paramètres dépendant de l'électrolyte tampon (sa nature, le pH, la force ionique, et la température), auxquels nous avons conservé le terme de paramètres libres.

BIBLIOGRAPHIE (III)

Certaines références bibliographiques sont mentionnées dans le texte sous forme d'un chiffre arabe, suivi d'un chiffre romain, par exemple 6-V, 4-II, 1-VI, etc ... ; il s'agit de travaux déjà cités dans un chapitre précédent. Dans ce cas :

- le chiffre I correspond à l'introduction,
 - les chiffres II à VII correspondent respectivement aux chapitres I à VI.
-

- 1 - BRINTON Jr C.C. et LAUFFER M.A., «Electrophoresis», M. Bier (Ed.) Academic Press New-York, 1959.
 - 2 - CHAPMAN D.L., Phil. Mag., 1913, 25, 475.
 - 3 - DEBYE P. et HUCKEL H., Physik. Z., 1923, 24, 185.
 - 4 - FALKENHAGEN H., «Electrolytes», Alcan (Paris), 1934.
 - 5 - GOUY G., J. Phys. Theor. Appl., 1910, 9, 457 ; Ann. Phys., 1917, 7, 129.
 - 6 - HEFTMANN E., «Chromatography», 2ème Ed., Reinhold Publishing Corporation, 1967.
 - 7 - HENRY D.C., Proc. R. Soc., 1931, AI 33, 106.
 - 8 - HUCKEL E., Phys. Z., 1924, 25, 204.
 - 9 - SHAW D.J., « Electrophoresis », Academic Press London and New-York, 1969.
 - 10 - SMOLUCHOWSKI M., Ds. : «Handbuch der Elektrizität und des Magnetismus», Graetz B. (Ed.), Vol. 2, Leipzig Germany, 1914, p 366.
 - 11 - STERN O., Z. Elektrochem., 1924, 30, 508.
 - 12 - WALDMANN-MEYER H., Chromatog. Rev., 1963, 5, 1.
-

CHAPITRE III

INFLUENCE DU MILIEU SUPPORT

La présence d'un milieu support est responsable de deux phénomènes spécifiques importants, d'une part un phénomène mécanique d'obstacle, qu'oppose tout support poreux à une migration linéaire et que l'on désigne volontiers sous le terme de « facteur structural » et d'autre part des phénomènes de rétention, dûs à l'adsorption ou à l'échange d'ions.

Par opposition aux « paramètres libres » précédemment définis, tels que la nature, la force ionique, le pH de l'électrolyte et la température, Waldman Meyer désigne sous le terme de « paramètres de zone » non seulement les phénomènes liés au facteur structural et à l'adsorption, mais aussi les phénomènes dûs à l'électro-osmose et à l'évaporation. Cependant, si ces derniers dépendent essentiellement de la nature du support et de l'appareillage utilisé, ils restent également sous l'influence des paramètres libres précédents, dont les valeurs doivent être soigneusement fixées pour chaque expérience.

I - Facteur structural :

Une première constatation générale concerne les mobilités sur milieu support, qui apparaissent systématiquement inférieures aux mobilités des

mêmes substances, mesurées en milieu liquide. Deux sortes d'explications ont été proposées, à la suite d'études expérimentales effectuées essentiellement par électrophorèse sur papier.

1 - Conception de Mac Donald (14) :

Dans un solide poreux, chaque pore peut être assimilé à un obstacle mécanique, dont l'effet de ralentissement serait moins marqué sur la migration des particules de petite taille et de forme régulière. Dans le cas du papier, les fibres exerceraient un effet identique, dont l'intensité serait fonction du volume moléculaire, de la forme et de la charge des particules considérées.

Sans tenir compte du flot électro-osmotique, ni des phénomènes d'adsorption, Mac Donald et Spitzer (15) ont mesuré les vitesses de migration électrophorétique de l'ion Ni^{2+} , de l'acide aspartique, du polyéthylène-glycol et de la polyvinyl-pyrrolidone sur trois types de papier différents ; ils observent de légères variations suivant le type de papier et, pour un même papier, une diminution de la mobilité des différents ions en fonction de leur taille.

2 - Conception de Kunkel et Tisélius :

Au cours d'une électrophorèse sur papier, la distance effective parcourue par un ion serait supérieure à la distance apparente mesurée en raison de l'existence d'un réseau compliqué de canaux semi-capillaires, constitué par la trame du papier. Cette conception est actuellement la plus répandue. Pour calculer sur un support donné une mobilité en solution libre, Kunkel et Tisélius ont proposé un facteur de correction qui ne dépendrait que de la structure du support. Pour ces auteurs, la nature du tampon utilisé et les propriétés physiques de la substance migrante étudiée pourraient être considérées comme négligeables. Ils déterminent ce «facteur structural» en comparant la conductivité d'une feuille de papier imprégnée de tampon, χ_e , à celle d'un liquide constitué par la même solution tampon χ .

Ce modèle schématique leur a permis de conclure, que le rapport de ces conductivités était égal au rapport des distances parcourues par les ions étudiés, d'une part en solution libre (1) et d'autre part au sein du papier (1_e) :

$$\frac{1}{l_e} = \frac{\chi_e}{\chi}$$

En réalité, comme l'ont montré Edward (6) et Schilling (21,22), le rapport des conductances correspondrait au carré du rapport des distances parcourues. On trouvera également dans d'autres publications (4, 25-27) des détails complémentaires, relatifs à la détermination de ce rapport.

La prédominance du facteur structural lié au support sur la nature du tampon, observée initialement par Kunkel et Tisélius, a été confirmée largement par Waldmann-Meyer et Schilling (30), avec les tampons acétate, phosphate et barbital, pour lesquels ils ont étudié diverses valeurs de pH et de force ionique.

Non seulement la nature de l'électrolyte semble sans influence, mais la conductivité du tampon imprégnant le papier reste identique à celle des solutions correspondantes, préparées extemporanément. Ces observations semblent donc indiquer que l'adsorption ionique sur le papier peut être négligée, mais il est évident que pour d'autres types de supports, ce phénomène devra éventuellement être pris en considération et justifier alors un nouveau facteur de correction. Une confirmation supplémentaire de la théorie de Kunkel et Tisélius a été apportée par Schilling et Waldmann-Meyer (22). D'après leurs observations, le dextrane, polysaccharide de charge négligeable et de poids moléculaire voisin de 10.000, aurait un parcours de migration effectif identique à celui des ions du tampon. Par ailleurs, Edward et Crawford (9) ont étudié, sur 4 types de papier, la migration électrophorétique d'ions ammonium quaternaire aliphatiques de poids moléculaires très différents ; ils constatent, qu'en négligeant les effets d'adsorption et en utilisant le même facteur de correction, les mobilités mesurées pour ces ions sont en accord satisfaisant avec les mobilités obtenues en milieu liquide.

Bien que fondée sur un modèle schématique, la théorie de Kunkel et Tisélius a au moins le mérite de tenter une comparaison quantitative entre l'électrophorèse sur support et l'électrophorèse en milieu liquide. Cependant,

il ne semble pas qu'elle s'oppose fondamentalement à la conception de Mac Donald. Il est possible que les effets d'obstacle mécanique d'une part et de migration sinueuse d'autre part s'additionnent et les deux théories précédentes seraient plutôt complémentaires.

En 1954, et en collaboration avec Trautmann, Kunkel (12) a repris son étude originale effectuée avec Tisélius. Il a notamment démontré que la distance effective de migration était en rapport étroit avec l'imprégnation liquide du support ; l'importance de cette teneur en humidité du support solide a été également soulignée par Mac Donald et collaborateurs (14).

3 - Essai de calcul d'un «Facteur obstructif» .

Tenant compte des études précédentes de Kunkel, Tisélius et Trautmann, Giddings et Boyack (3,10) ont proposé récemment une interprétation physique plus générale de la migration sur support. Ils définissent notamment un facteur obstructif ξ , comme étant le rapport de la mobilité apparente sur support (m_a), à la mobilité en solution libre (m_f).

$$\xi = \frac{m_a}{m_f} \quad (1)$$

Ce facteur serait relié au rapport des conductivités électriques du milieu électrophorétique semi-solide d'une part et de l'électrolyte seul d'autre part. Ils définissent de plus deux facteurs influençant la valeur du rapport ξ et dont l'importance relative dépend de la nature du support et de son imprégnation liquide :

- un facteur de tortuosité T, d'abord défini sur papier par Kunkel et Tisélius et qui a été généralisé plus récemment à divers milieux poreux (13).
- un facteur de constriction C qui varie en fonction de l'aire de section droite des canaux semi-capillaires.

Si ces deux effets s'additionnent, on arrive à la relation :

$$\xi = C T^{-2} \quad (II)$$

Ces auteurs ont déterminé l'expression de C et de T pour différents types de particules constituant le support solide : sphères, cubes d'orientation diverses, fibres etc ...

Ces équations permettraient de calculer un «facteur obstructif» caractéristique de différents supports non conducteurs et non sensibles au gonflement, tels que le verre ou certaines résines. Néanmoins, leurs applications systématiques aux études électrochromatographiques apparaissent peu précises. En effet, selon la nature du support, d'autres phénomènes entrent en ligne de compte, tels que le tamisage moléculaire dans les gels, et dans les fibres de cellulose notamment des phénomènes d'exclusion sélective des substances en solution. Si l'on tient compte également des phénomènes d'adsorption ou d'échange d'ions, qui pour certains supports, peuvent être relativement importants, on se rend compte de la complexité du problème et les relations proposées s'avèrent très souvent insuffisantes.

II - Adsorption :

1 - Considérations générales :

Si l'on met volontairement à part les phénomènes d'échange d'ions véritables, mieux connus pour certains supports, les phénomènes d'adsorption proprement dits correspondraient à l'ensemble des forces intermoléculaires, qui s'exercent entre les atomes de surface d'un solide et des molécules libres telles que l'eau. Il s'agit en particulier des forces de London et des forces de type électrostatique, telles qu'on les rencontre dans les liaisons polaires et les liaisons hydrogène . Ainsi, l'adsorption dépendra essentiellement non seulement de la nature du support lui-même, mais aussi de la nature de la substance migrante étudiée. Sur la cellulose et le papier, son importance est relativement faible pour des ions organiques de taille moyenne. Par contre, elle est loin d'être négligeable, lorsque les ions organiques présentent des surfaces planes hydrophobes supérieures à $50 \text{ \AA}^2$ (8), tels que les anions d'acides organiques de condensation supérieure à 10 atomes de carbone, les ions ammonium quaternaires

homologues supérieurs du n-décyl ammonium, certains acides aminés aromatiques (24), de même que certains colorants de poids moléculaire élevé. Ces phénomènes d'adsorption pourraient être considérablement atténués, en ajoutant à l'électrolyte tampon certaines substances comme l'éthanol, l'acide acétique, l'urée ou le formamide, molécules polaires de petite taille. Inversement, l'adsorption pourrait être favorisée par l'addition d'autres substances (8) ; c'est ainsi que les ions ammonium quaternaire aliphatiques sont fortement adsorbés sur le papier en présence d'un ion carboxylate aliphatique, si le nombre d'atomes de carbone des groupements alcoyle de l'anion et du cation est supérieur à 10. En ce qui concerne les grosses molécules, seule l'adsorption des protéines sur le papier a fait l'objet d'une étude particulière (28). Certains auteurs (30) ont été amenés à différencier, en électrophorèse de zone, des phénomènes d'adsorption réversible et irréversible, dont l'influence sur la vitesse de migration se traduirait par une répartition variable des substances migrantes sur le support. Dans le cas d'une adsorption irréversible, la distance de migration serait influencée par la concentration de la substance migrante elle-même (19. I, 17, 20). Sous l'influence également de la force ionique ou de la conductivité, la diffusion de la substance étudiée au cours de la migration peut conduire à la formation de spots de forme variable (7, 19, 23, 31).

On est loin, cependant d'une explication univoque de tous les phénomènes en cause et, pour l'instant, seule une détermination globale de l'adsorption semble possible lors de chaque expérience. On en arrive ainsi à mesurer systématiquement, pour une substance migrante donnée, un coefficient de rétention par les supports en fonction de certains paramètres, tels que le pH, la force ionique ou la température.

2 - Mise en évidence. Mesure.

Certains auteurs, dont Michl (16), se sont contentés de déceler les possibilités d'adsorption de certaines substances, telles que les protéines, sur différents types de papier. Kunkel et collaborateurs (15 - I, 11) ont décrit trois méthodes d'évaluation plus précises de l'adsorption.

- a) Chromatographie sur le même papier et avec le même tampon d'électrophorèse ; les trainées observées, plus ou moins importantes, donnent une idée de l'intensité du phénomène.

- b) Electrophorèse à deux dimensions : avec observations similaires.
- c) Electrophorèse réversible en changeant le sens du courant, sans changer la direction de migration. Les traces de substances, non parvenues au point de départ, rendent compte de l'intensité de l'adsorption.

Des évaluations quantitatives ont été également proposées.

Kraus et Smith (14 - I.) ont calculé ainsi la rétention de Hg^{2+} par chromatographie sur papier, en utilisant les valeurs de R_f obtenues pour corriger les mobilités. Adoptée par certains auteurs (1, 5, 18, 29, 32.) cette méthode a été légèrement modifiée par Bermès et Mac Donald (2) puis par Edward et Waldron-Edward (6 - II.). Waldmann-Meyer (28), Waldmann-Meyer et Schilling (30) introduisent un facteur d'adsorption ρ dont la valeur est toujours inférieure ou égale à l'unité et qui permet d'évaluer ainsi le degré de ralentissement, provoqué par les phénomènes d'adsorption et de tamisage moléculaire, caractéristiques de l'ion étudié. Cette détermination de ρ est fondée sur la mesure des déplacements ioniques consécutifs à l'évaporation, provoquée par le passage d'un courant alternatif dans une feuille de papier imprégnée d'électrolyte et non réfrigérée.

BIBLIOGRAPHIE (IV)

Certaines références bibliographiques sont mentionnées dans le texte sous forme d'un chiffre arabe, suivi d'un chiffre romain, par exemple 6-V, 4-II, 1-VI, etc ..; il s'agit de travaux déjà cités dans un chapitre précédent. Dans ce cas :

- le chiffre I correspond à l'introduction,
 - les chiffres II à VII correspondent respectivement aux chapitres I à VI.
-

- 1 - BARRET A.J.G. et SMITH D.K., J. Sci. Food Agr., 1955, 6, 53.
- 2 - BERMES E.W. et MAC DONALD H.J., J. Chromatog., 1960, 4, 34.
- 3 - BOYACK J.R. et GIDDINGS J.C., Arch. Biochem. Biophys., 1963, 100, 16.
- 4 - CRAWFORD R. et EDWARD J.T., Anal. Chem., 1957, 29, 1543.
- 5 - DOBBIE H., KERMACK W.O., et LEES H., Biochem. J., 1955, 59, 240.
- 6 - EDWARD J.T., J. Chromatog., 1958, 1, 446.
- 7 - EDWARD J.T., Chem. and Ind. (London) 1958, p 276.
- 8 - EDWARD J.T. et CRAWFORD R., Chem. and Ind. (London), 1956, p 1274.
- 9 - EDWARD J.T. et CRAWFORD R., J. Chromatog., 1958, 1, 449.
- 10 - GIDDINGS J.C. et BOYACK J.R., Anal. Chem., 1964, 36, 1229.
- 11 - KUNKEL H.G., ds. «Methods of Biochemical Analysis», D. Glick Ed., Interscience New-York, 1954.
- 12 - KUNKEL H.G. et TRAUTMANN R., ds. «Methods of Biochemical Analysis», M. Bier Ed., Interscience New-York, 1954.
- 13 - KUNKEL H.G. et TRAUTMANN R., «Electrophoresis», M. Bier Ed., Academic Press New-York, 1959, p 226.
- 14 - MAC DONALD H.J., LAPPE R.J., MARBACH E.P., SPITZER R.H. et URBIN M.C., «Ionography : electrophoresis in stabilized media», Year Book Publ. Chicago, 1955.
- 15 - MAC DONALD H.J. et SPITZER R.H., Circulation Res., 1953, 1, 396.
- 16 - MICHL H., Monatsh., 1952, 83, 210.

- 17 - MONTY K.J., MORRISSON M., ALLING E. et STOTZ E., *J. Biol. Chem.*, 1956, 220, 295.
 - 18 - PUCAR Z. et JAKOVAC Z., *J. Chromatog.*, 1959, 2, 320.
 - 19 - SATO T. R., KISIELESKI W.E., NORRIS W.P. et STRAIN H.H., *Anal. Chem.*, 1953, 25, 438.
 - 20 - SATO T.R., NORRIS W.P. et STRAIN H.H., *Anal. Chem.*, 1955, 27, 521.
 - 21 - SCHILLING K. et WALDMANN-MEYER H., *Kem. Maanedstidsskr.*, 1958, 39, 81.
 - 22 - SCHILLING K. et WALDMANN-MEYER H., *Acta Chem. Scand.*, 1959, 13, 1.
 - 23 - SCHONBERG T. et BRODA E., *Microchim. Acta*, 1951, 36/37, 537.
 - 24 - SYNGE R.L.M. et TISELIUS A., *Acta Chem. Scand.*, 1949, 3, 23 ; DALGLIESH C.E., *J. Chem. Soc.*, 1952, 3, 1940.
 - 25 - VACIK J. et CABICAR J., *Collection Czech. Chem. Commun.*, 1960, 25, 404.
 - 26 - VACIK J., GRUBNER O. et DVORACK J., *Collection Czech. Chem. Commun.*, 1960, 25, 625.
 - 27 - VALMET E. et SVENSSON H., *Sci. Tools*, 1954, 1, 3.
 - 28 - WALDMANN-MEYER H., *Chromatog. Rev.*, 1963, 5, 1.
 - 29 - WALDMANN-MEYER H. et SCHILLING K., *Science* 1956, 124, 1028.
 - 30 - WALDMANN-MEYER H. et SCHILLING K., *Acta Chem. Scand.*, 1959, 13, 13.
 - 31 - WEBER R., *Helv. Chim. Acta*, 1953, 36, 424.
 - 32 - YASUNAGA S. et SHIMOMURA O., *J. Pharm. Soc. Japan*, 1954, 74, 62.
-

CHAPITRE IV

EFFET ELECTRO—OSMOTIQUE

Au cours de l'électrophorèse sur support, les phénomènes se produisant aux interfaces solides-liquides polaires sont également susceptibles de modifier les mobilités mesurées. Mises en contact avec un milieu polaire, la plupart des substances acquièrent en effet une charge électrique de surface négative : ce phénomène est dû à l'hydratation beaucoup moins marquée des anions, dont l'adsorption spécifique reste ainsi supérieure à celle des cations. Il est évident également que des surfaces, chargées par ionisation, ont tendance à adsorber préférentiellement des ions de signe opposé. Il s'ensuit donc une influence constante de la charge de surface, sur la distribution des ions dans un milieu polaire. Les ions de charge opposée sont attirés vers la surface considérée, tout en restant soumis à une agitation thermique et ce phénomène conduit à la formation d'une couche double électrique. Si un champ électrique est appliqué tangentiellement à la surface chargée, deux forces de sens opposé tendent à s'exercer sur les deux parties de la couche double. La surface chargée constituée par le support restant immobile, la partie mobile de la couche tend à migrer dans la direction opposée en entraînant le solvant avec elle : il se produit ainsi un courant liquide appelé flot électro-osmotique. Ce phénomène d'électro-osmose est caractéristique de toute électrophorèse sur support.

I - Etude théorique du phénomène d'électro-osmose.

Par comparaison avec les phénomènes, qui se produisent au sein d'un capillaire parcouru par un liquide sous pression, il a été possible de dégager un certain nombre de notions fondamentales, concernant l'électrophorèse sur support. On trouvera, dans quelques publications (12-IV, 18) et plus

particulièrement dans l'ouvrage récent de Shaw (28), des détails précis se rapportant aux phénomènes électrocinétiques, ainsi qu'aux notions de potentiel dynamique et de sédimentation. Déjà étudiée précédemment et valable pour des particules de grandes dimensions, l'équation de Smoluchowski convient parfaitement pour la détermination de mobilités électro-osmotiques. Elle s'écrit :

$$u_{eo} = \frac{\epsilon_o D \zeta}{4 \pi \eta} \quad (I)$$

et peut encore s'exprimer par :

$$v_{eo} = \frac{\epsilon_o E D \zeta}{4 \pi \eta} \quad (II)$$

où v_{eo} représente la vitesse du flot électro-osmotique, les autres paramètres ayant déjà été définis. En réalité, ce que l'on mesure expérimentalement est plutôt la vitesse du flot volumique que la vitesse du flot électro-osmotique. Par analogie, dans une capillaire de section droite A, la vitesse du flot volumique V_{eo} est donnée par :

$$V_{eo} = A v_{eo} = \frac{A E D \zeta \epsilon_o}{4 \pi \eta} \quad (III)$$

Mais, d'après la loi d'Ohm, on peut écrire :

$$A E = I / K_o$$

dans laquelle I désigne l'intensité du courant électrique et K_o la conductance spécifique du liquide. On arrive ainsi à l'équation :

$$V_{eo} = \frac{\epsilon_o D I \zeta}{4 \pi \eta K_o} \quad (IV)$$

qui semble susceptible d'être généralisée aux solides poreux, tels que les supports électrophorétiques. L'équation (IV) montre que l'importance du flot électro-osmotique dépend de plusieurs facteurs, qui varient selon les conditions expérimentales. Le potentiel ζ , défini précédemment d'après l'équation :

$$\zeta = \frac{Q_A}{\epsilon_o D r_A (1 + K r_A)}$$

est sous l'influence directe de la charge réelle Q_A à la surface, de la constante diélectrique D du milieu polaire considéré et de la force ionique de l'électrolyte. Une augmentation de la force ionique du milieu entraîne en effet une diminution de l'épaisseur $1/K$ de la couche double, se traduisant finalement par une chute du potentiel ζ . D'autre part, l'influence prépondérante du champ électrique est mise en évidence dans l'équation (II). Etant donné que le flot électro-osmotique dépend d'un grand nombre de variables, il est évident que les relations précédentes ne peuvent être qu'approximatives ; elles ont néanmoins le mérite de mettre en relief les facteurs essentiels qui influent sur l'électro-osmose.

TABLEAU III

CALCULS DE VITESSES DE FLOT ELECTRO-OSMOTIQUE ET DE FLOT VOLUMIQUE

Supposons qu'il s'agisse d'une solution aqueuse et que l'on ait $E = 10$ volts/cm, $\zeta = 10$ millivolts, $I = 20$ milliampères et $K_o = 0,5 \cdot 10^{-2} \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. En utilisant d'une part le système C.G.S. et d'autre part le système M.K.S.A., il est possible de calculer, à partir des équations (II) et (IV), les vitesses de flot électro-osmotique et de flot volumique. Les résultats obtenus, parfaitement identiques dans les deux systèmes, correspondent évidemment à des valeurs arbitraires choisies pour les divers paramètres.

Système C.G.S.	Système M.K.S.A.
$\text{I) } v_{eo} = \frac{\epsilon_o \cdot D \cdot E \cdot \zeta}{4 \pi \eta} \quad \text{(II)}$ (v_{eo} = vitesse du flot électro-osmotique)	
$\epsilon_o = 1 / 4 \pi$ $D = 80$ $E = 10 \text{ volts / cm} = 1 / 30 \text{ U.E.S.C.G.S. / cm}$ $\zeta = 10 \text{ millivolts} = 10^{-4} / 3 \text{ U.E.S.C.G.S.}$ $\eta = 1 \text{ centipoise} = 10^{-2} \text{ poise}$	$\epsilon_o = 1 / 36 \pi \cdot 10^9$ $D = 80$ $E = 10 \text{ volts / cm} = 10^3 \text{ volts / m}$ $\zeta = 10 \text{ millivolts} = 10^{-2} \text{ volt}$ $\eta = 1 \text{ centipoise} = 10^{-3} \text{ décapoise}$
$v_{eo} = \frac{80 \cdot 10^{-4}}{30 \cdot 3 \cdot 16 \pi^2 \cdot 10^{-2}} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ $= 0,56 \cdot 10^{-4} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$	$v_{eo} = \frac{10^3 \cdot 80 \cdot 10^{-11}}{36 \pi \cdot 4 \pi \cdot 10^{-3}} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ $= 0,56 \cdot 10^{-6} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1} = 0,56 \cdot 10^{-4} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$
Soit $v_{eo} = 0,20 \text{ cm/h}$	Soit $v_{eo} = 0,20 \text{ cm/h}$

Système C.G.S.	Système M.K.S.A.
II) $V_{eo} = \frac{\epsilon_o \cdot D \cdot I \cdot \zeta}{4 \pi \eta K_o} \quad (IV)$ (V_{eo} = vitesse du flot volumique) $\epsilon_o = 1 / 4 \pi$ $D = 80$ $I = 20$ milliampères $= 2 \cdot 10^{-2} \cdot 3 \cdot 10^9$ U.E.S.C.G.S. $K_o = 5 \cdot 10^{-3} \Omega^{-1} \cdot cm^{-1} = 5 \cdot 10^{-3} \cdot 9 \cdot 10^{11}$ U.E.S.C.G.S.cm^{-1} $V_{eo} = \frac{80 \cdot 6 \cdot 10^7 \cdot 10^{-4}}{3,16 \pi^2 \cdot 10^{-2} \cdot 45 \cdot 10^8} \quad cm^3 \cdot s^{-1}$ $= 0,22 \cdot 10^{-4} cm^3 \cdot s^{-1}$ Soit $V_{eo} = 0,08 cm^3 / h$	$\epsilon_o = 1 / 36 \pi \cdot 10^9$ $D = 80$ $I = 20$ milliampères $= 2 \cdot 10^{-2}$ ampère $K_o = 5 \cdot 10^{-3} \Omega^{-1} \cdot cm^{-1} = 0,5 \Omega^{-1} \cdot m^{-1}$ $V_{eo} = \frac{80 \cdot 2 \cdot 10^{-9} \cdot 10^{-2} \cdot 10^{-2}}{36 \pi \cdot 4 \pi \cdot 10^{-3} \cdot 0,5} \quad m^3 \cdot s^{-1}$ $= 0,22 \cdot 10^{-10} m^3 \cdot s^{-1} = 0,22 \cdot 10^{-4} cm^3 \cdot s^{-1}$ Soit $V_{eo} = 0,08 cm^3 / h$

II - Observations expérimentales.

La diminution du flot électro-osmotique en fonction d'une force ionique croissante a été confirmée tout d'abord par Raacke (23), ainsi que par les études systématiques de Engelke et collaborateurs (10). D'autres recherches (15-I, 9, 10, 24) ont permis ultérieurement de démontrer l'augmentation de la valeur du flot en fonction du pH. C'est ainsi que, dans un tampon barbital 0,142 M, Schleyer (26) a observé une croissance pratiquement linéaire du potentiel ζ en fonction du pH ; son étude a porté sur différents supports, tels que le verre, le quartz, le polyéthylène, le chlorure de polyvinyle et notamment le papier Schleicher-Schüll N° 20 - 40 a, pour lequel il a enregistré le potentiel le plus bas. Une observation intéressante, enregistrée par Kiso (13), concerne l'inversion de la migration du flot électro-osmotique sur papier et à pH = 4, pour le système tampon (HCl ; N H₃ ; acétate d'ammonium) Engelke et collaborateurs (9) ont observé également le même phénomène sur papier et à pH = 4,3 avec un tampon phosphate. Ces inversions peuvent être expliquées semble-t-il par une diminution de l'ionisation des groupements carboxyliques du papier pour des valeurs de pH inférieures à 5 ; si le support n'est pas complètement inerte, ce qui est le plus souvent le cas, le pH agirait donc en modifiant son degré d'ionisation. On constate en outre que, plus une surface est riche en groupements ionisables, plus elle est susceptible d'acquérir une charge importante et plus le flot électro-osmotique observé est grand. C'est ainsi que, dans le gel d'agar, par exemple, contenant un nombre élevé de groupements sulfates, le flot électro-osmotique est très important (25), on a décrit notamment la migration vers la cathode de particules de charge nulle, qui n'étaient en réalité que déplacées par le flot électro-osmotique. En ce qui concerne le champ électrique Engelke et collaborateurs (10) démontrent que son influence sur la vitesse électro-osmotique est proportionnelle à son intensité. Ces auteurs montrent également que la texture du papier, son degré d'imprégnation liquide, de même que la durée de l'expérience n'ont qu'une influence minime sur la vitesse du flot électro-osmotique, comparativement à la nature chimique du papier et de l'électrolyte. De toutes les observations précédentes, il ressort que l'influence du flot électro-osmotique semble s'exercer sur toutes les particules indépendamment de leur charge ;

il apparaît en outre pratiquement constant en tout point du support, si les conditions expérimentales sont parfaitement définies et en particulier le pH, la force ionique, la nature du tampon et bien entendu la nature du support lui-même. (21-IV, 1, 6, 7, 10, 35, 37).

III - Mesure du flot électro-osmotique.

Un certain nombre de méthodes ont été proposées, pour mesurer le flot électro-osmotique au cours d'une électrophorèse sur support. Théoriquement l'eau transportée à travers le support peut être évaluée directement. C'est ainsi que Stefanovitch (30) a mesuré les volumes d'électrolyte avant et après électrophorèse, dans les deux compartiments anodique et cathodique ; il a observé que le volume à la cathode augmentait d'environ 6 à 8 %, au cours d'une expérience d'une heure, réalisée sur gel de silice et en milieu tampon borate. Cependant, il convient de souligner qu'une telle détermination est relativement délicate et ne conduit pas toujours à une mesure précise de la vitesse du flot électro-osmotique.

On a proposé d'autre part, l'utilisation de nombreuses substances de charge pratiquement nulle, dont Longsworth a effectué une étude critique détaillée (14). Transportées « passivement » par le courant liquide, elles peuvent servir de substances de référence, à condition de pouvoir négliger d'une part et en ce qui les concerne, les phénomènes d'adsorption et de tamisage moléculaire et d'autre part les phénomènes d'évaporation. Quant au poids moléculaire des substances de référence utilisées, certains auteurs (2) pensent que leur taille doit être du même ordre de grandeur que celle des ions de l'électrolyte, pour que l'influence du flot électro-osmotique soit comparable dans les deux cas. Il convient de souligner cependant, que des substances de poids moléculaire relativement faible, comme la caféine, la dinitrophénylarginine, ainsi qu'un amide dérivé de la dinitro-phénylsérine, demeurent pratiquement stationnaires sur un support à base d'amidon, qui est pourtant le siège d'un flot électro-osmotique intense (19). Raacke (23) explique ce phénomène de la façon suivante : ces substances de faible poids moléculaire seraient susceptibles de passer à travers la membrane semi-perméable, limitant les grains d'amidon et

subiraient ensuite une rétention plus ou moins importante à l'intérieur de ces derniers. En outre, les molécules de petite taille sont plus sensibles aux phénomènes de diffusion, ce qui rend la détermination de leur migration relativement imprécise. Sur gel d'agar, Uriel (31) constate de son côté un certain ralentissement des substances de poids moléculaire important, de l'ordre de 20 000 à 200 000, qu'il attribue à des phénomènes de tamisage moléculaire. Bussard et Perrin (1) ont effectué, dans le même milieu, des mesures systématiques et les valeurs trouvées sont fréquemment plus importantes que celles observées sur papier, pour un même pH et une force ionique identique.

Parmi les différentes substances, proposées comme indicateur du flot électro-osmotique, nous signalerons tout d'abord la caféine (5), la créatine et la proline (4), l'acétone ou la benzophénone (21), la N - β - hydroxyéthyl - 2,4 dinitroaniline (16), l'eau oxygénée (3, 11, 13), l'hydrazine (9) et l'urée (34) ; par contre, l'o-nitroaniline ne semble pas avoir donné de résultats satisfaisants (9-IV, 12). Enfin, l'emploi des mono et polysaccharides s'est généralisé depuis quelques années et nous mentionnerons en particulier le glucose (1-I, 14-I, 6, 8, 17, 20, 37), le tétraméthylglucose, le saccharose (35, 36), le xylose (27) et le dextrane (15-I, 19-I, 22-IV, 30-IV, 15, 22, 33). Comme Smith l'a déjà signalé (29), il semble que, pour des expériences concernant des petites molécules, les substances de référence les plus utilisées soient le glucose et l'urée ; pour les molécules de plus grandes dimensions, les substances de référence les plus courantes seraient la polyvinyl-pyrrolidone et le dextrane. La valeur de cette méthode, dite de « l'indicateur de flot », paraît incontestable, bien que dans certaines conditions toutefois, il reste possible à un composé réputé électriquement neutre d'acquérir une charge significative. En dépit de certaines imperfections, la technique de l'indicateur peut donc actuellement être considérée comme la méthode de choix, pour l'évaluation du flot électro-osmotique, mais il convient de tenir compte également du phénomène d'évaporation, dont nous envisagerons l'importance dans l'un des paragraphes suivants.

BIBLIOGRAPHIE (V)

Certaines références bibliographiques sont mentionnées dans le texte sous forme d'un chiffre arabe, suivi d'un chiffre romain, par exemple 6-V, 4-II, 1-VI, etc... ; il s'agit de travaux déjà cités dans un chapitre précédent. Dans ce cas :

- le chiffre I correspond à l'introduction,
- les chiffres II à VII correspondent respectivement aux chapitres I à VI.

- 1 - BUSSARD A. et PERRIN D., J. Lab. Clin. Med., 1955, 46, 689.
- 2 - C.I.B.A. Foundation Symposium on Paper Electrophoresis, J. et A. Churchill, Ltd., London, 1956.
- 3 - CLANET F., CLARENCE J. et VERRY M., J. Chromatog., 1964, 13, 440.
- 4 - CONSDEN R. et STANIER W.M., Nature, 1952, 169, 783.
- 5 - CRESTFIELD A.M. et ALLEN F.W., Anal. Chem., 1955, 27, 422.
- 6 - DE WAEL J., Chem. Weekblad., 1953, 49, 229.
- 7 - DE WAEL J., C.I.B.A. Foundation Symposium on Paper Electrophoresis, J. et A. Churchill, Ltd., London, 1956.
- 8 - DE WAEL J. et PUNT K., Clin. Chim. Acta, 1957, 2, 403.
- 9 - ENGELKE J.L. et STRAIN H.H., Anal. Chem., 1954, 26, 1872.
- 10 - ENGELKE J.L., STRAIN H.H. et WOOD S.E., Anal. Chem., 1954, 26, 1864.
- 11 - GUSTINIANI M., FARAGLIA G. et BARBIERI R., J. Chromatog., 1964, 15, 207.
- 12 - JERMYN M.A. et THOMAS R., Nature, 1953, 172, 728.
- 13 - KISO Y., KOBAYASHI M., KITAOKA M., KAWAMOTO K. et TAKADA J., J. Chromatog., 1968, 36, 215.
- 14 - LONGSWORTH L.G., J. Am. Chem. Soc., 1947, 69, 1288.
- 15 - MACHEBOEUF M., Chem. Weekblad., 1953, 49, 237.
- 16 - MOULD D.L. et SYNGE R.L.M., Biochem. J., 1954, 58, 585.
- 17 - MUKHERJEE S.K. et LAHIRI M.M., Sci. Cult. (Calcutta), 1966, 32, 39.

- 18 - OVERBEEK J.T.G. et LYKLEMA J., «Electrophoresis», M. Bier (Ed.), Academic Press New-York, 1959.
 - 19 - PARCELLS A.J. cité par RAACKE I.D., J. Am. Chem. Soc., 1958, 80, 3055.
 - 20 - PEETERS H. et VUYLSTEKE P., 4ème Colloq. St. Jans. Hosp. Brugge, De Tempel Brugge, 1956, p 63.
 - 21 - PENISTON Q.P., AGAR H.D. et MAC CARTHY J.L., Anal. Chem., 1951, 23, 994.
 - 22 - POHLIT W. et SCHITTKO H., Kolloid. Z., 1958, 156, 71.
 - 23 - RAACKE I.D., J. Am. Chem. Soc., 1958, 80, 3055.
 - 24 - RAACKE I.D. et LI C.H., J. Biol. Chem., 1955, 215, 277.
 - 25 - ROBINSON R.A., ROBSON M., HARRISSON A.P. et ZUELZER W.W., J. Lab. Clin. Med., 1957, 50, 745.
 - 26 - SCHLEYER M., Z. Physiol. Chem., 1958, 311, 29.
 - 27 - SCHWIMMER S., Arch. Biochem. Biophys., 1953, 43, 108.
 - 28 - SHAW D.J., «Electrophoresis», Academic Press New-York, 1969, p 76.
 - 29 - SMITH I. (Ed.), «Chromatographic and Electrophoretic Techniques». 2ème Ed., 1968, Vol. II, p 10.
 - 30 - STEFANOVITCH V., J. Chromatog., 1967, 31, 466.
 - 31 - URIEL J., Clin. Chim. Acta, 1958, 3, 384.
 - 32 - WALDMANN-MEYER H., J. Biol. Chem., 1960, 235, 3337.
 - 33 - WALDMANN-MEYER H., NIELSEN E. et ASTRUP T., Proc. 8ème Congr. European Soc. Hematol. Vienna 1961, Commun. N° 456.
 - 34 - WALDRON-EDWARD D., J. Chromatog., 1965, 20, 556.
 - 35 - WHITEHEAD J.K., Biochem. J., 1958, 68, 653.
 - 36 - WOOD S.E. et STRAIN H.H., Anal. Chem., 1954, 26, 1869.
 - 37 - WOODS E.F. et GILLEPSIE J.M., Australian J. Biol. Sci., 1953, 6, 130.
-

CHAPITRE V

NOTION DE « FLOT DU TAMPON »

Au cours d'une électrophorèse sur support, les courants liquides observés peuvent être d'origines diverses. Une simple différence de niveau liquide entre les deux compartiments anodique et cathodique s'avère déjà suffisante, pour provoquer par capillarité un mouvement liquide plus ou moins important. Il s'agit là d'un phénomène que l'on peut facilement éviter en ajustant parfaitement le niveau dans ces deux compartiments.

Par contre, deux autres phénomènes sont directement liés au passage du courant, il s'agit de l'électro-osmose, qui a fait l'objet d'une analyse approfondie dans le chapitre précédent et de l'évaporation, due à l'effet Joule, que nous allons étudier.

I - Evaporation.

La chaleur, dégagée par effet Joule, entraîne une évaporation partielle de la solution tampon, qui imprègne le substrat. Cette évaporation provoque un appel de liquide, migrant par capillarité depuis chacun des compartiments, vers le centre du support. L'intensité de cette migration est d'ailleurs très variable en différents points de la surface de ce dernier. La vitesse du flot

liquide semble directement proportionnelle à la distance, qui sépare le centre géométrique du substrat à chacun des réservoirs de tampon ; plusieurs auteurs (19 - I, 22 - IV, 6 - V, 22 - V, 35 - V, 37 - V) ont démontré expérimentalement cette proportionnalité, en mesurant les déplacements d'une substance non chargée, déposée régulièrement sur l'axe longitudinal du support. En reliant les déplacements observés aux positions de départ, ils ont pu obtenir des relations linéaires dans les conditions expérimentales suivantes :

- 1) Température et pression de vapeur uniformes dans toute l'enceinte électrophorétique.
- 2) Equilibre hydraulique parfaitement réalisé par capillarité, entre le support et les réservoirs du tampon, ce qui correspond à une imprégnation liquide optimale du substrat.
- 3) Dépôt des substances migrantes suffisamment éloigné des bords du support, où existe un certain gradient d'évaporation (effet de bord).

Malgré ces précautions, l'uniformité du flot liquide résultant de l'évaporation est difficilement obtenue et ceci complique l'évaluation précise des mobilités électrophorétiques sur support.

Waldmann-Meyer (28 - IV) estime qu'une détermination valable reste possible, en effectuant certaines corrections ; d'autres auteurs (2 - I, 24 - I, 31 - I, 27 - IV, 2 - V, 24) pensent au contraire que l'augmentation de la concentration en électrolyte, provoquée par l'évaporation rend impossible toute analyse correcte de la migration, en raison des variations de la conductivité, de champ électrique et de la température.

II - Flot du tampon.

Au cours d'une électrophorèse sur support en chambre humide, il est possible de déterminer la part respective, qui revient à l'électro-osmose et à l'évaporation dans le flot liquide total. Ce dernier peut être mesuré au cours d'une électrophorèse normale sous courant continu ; en remplaçant dans les mêmes conditions expérimentales le courant continu par un courant alternatif, on évite ainsi les effets de l'électro-osmose et la migration obtenue permet de

mesurer exactement le flot d'évaporation à la surface du substrat non réfrigéré. L'intensité du flot électro-osmotique est obtenue par différence, entre le flot total du tampon et le flot dû à l'évaporation.

Au cours de la mise au point d'une technique d'électrophorèse, fondée sur le contrôle et la régulation du phénomène d'évaporation (électro-rhéophorèse), Machebœuf et collaborateurs (19 - I, 20 - I, 15 - V.) ont réalisé l'une des premières études du flot du tampon en chambre humide. Les résultats obtenus leur ont permis de confirmer un principe, déjà énoncé par Durrum (6), selon lequel toutes les substances soumises à l'électrophorèse migrent, dans ces conditions expérimentales, vers une position finale d'équilibre, où les différentes forces responsables de leurs mouvements se neutralisent. Pour une substance électriquement neutre et si l'évaporation était le seul phénomène en cause, le point d'équilibre π devrait se situer sur la ligne médiane du support ; mais en raison de l'électro-osmose, ce point d'équilibre est déplacé généralement vers la cathode pour des substrats tels que le papier. Il est évident qu'en raison de sa charge, un ion quelconque ne peut atteindre son point d'équilibre sur la même ligne :

Utilisant la technique d'électro-rhéophorèse de Machebœuf (20-I, 17), Dauphin, Andraud et Berger (5) ont développé une théorie originale, tenant compte des phénomènes d'électro-osmose et d'évaporation. L'étude du déplacement électrophorétique en fonction du temps aboutit à une expression exponentielle, dans laquelle ils font apparaître un nouveau paramètre B, caractéristique du milieu support et de la substance étudiée. Ces auteurs ont donné à ce paramètre le nom de « mobilité apparente » et semblent être les premiers à avoir souligné son importance pratique, en vue de la détermination des mobilités électrophorétiques sur support. Leurs vérifications expérimentales ont essentiellement porté sur des mesures de migration de l'hémoglobine et de la sérumbumine.

D'autres études quantitatives ont été réalisées par la suite, en maintenant constants soit le champ électrique (22 - V, 35 - V, 1, 19), soit l'intensité du courant (21 - IV, 22 - IV).

Toutes les expériences précédentes ont été effectuées sur papier et les premiers renseignements, concernant d'autres types de substrats, ont été fournis

par Kowalczyk, lors d'une étude générale sur les processus électrophorétiques en chambre humide (12 - II, 7 - 15.)

Utilisant le papier filtre Watmann n° 1 comme référence, cet auteur a expérimenté le papier en fibre de verre, ainsi que des couches minces de 2 mm d'épaisseur à base d'amidon, de dioxyde de titane, d'albumine, de kaolin et de gel de silice ; deux liquides conducteurs ont été employés, d'une part une solution aqueuse de $\text{HCl } 0,05 \text{ N}$ et d'autre part une solution tampon acétate-véronal de $\text{pH} = 8,6$. L'interprétation de ses résultats lui a permis de mettre en évidence deux types de systèmes principaux :

1) Systèmes caractérisés par une zone d'équilibre hydrostatique π située sur le support lui-même ; il s'agit par exemple des systèmes à base d'amidon, de kaolin ou de papier et de la solution de $\text{HCl } 0,05 \text{ N}$ ou du tampon acétate-véronal.

2) Systèmes pour lesquels cette zone d'équilibre π serait en réalité une zone hypothétique, située au-delà du support. Il s'agit en particulier des systèmes à base de dioxyde de titane, d'alumine ou de gel de silice et de la solution de $\text{HCl } 0,05 \text{ N}$ ou des systèmes à base d'alumine ou de gel de silice et du tampon acétate-véronal.

Il semble que dans les systèmes du second type, à zone π délocalisée, le flot du tampon est unidirectionnel et uniformément croissant ; son étude s'avère du reste moins complexe, que celle des systèmes du premier type. Poursuivant ses études, Kowalczyk (12) a proposé une expression mathématique du flot du tampon, valable pour les deux types de systèmes ; il a donné également une relation exprimant la mobilité électrophorétique sur support et en chambre humide. L'analyse des travaux précédents fait ressortir le rôle complexe, sur la migration électrophorétique, des phénomènes dus à l'évaporation. Il semble en particulier difficile de déterminer des mobilités ioniques corrigées, en se fondant uniquement sur la mesure du flot du tampon par la méthode de l'indicateur neutre, décrite précédemment. En raison même de leur charge, les substances ionisées auront toujours en effet une migration plus importante que celle de l'indicateur non chargé et seront soumises, de ce fait, à un flot de tampon différent. Le facteur de correction, calculé par la méthode de l'indicateur, ne peut donc

être appliqué valablement aux déplacements ioniques, si ce n'est dans des conditions expérimentales bien particulières et surtout si l'évaporation peut être totalement supprimée. Aussi a-t-on cherché à réduire l'influence des phénomènes d'évaporation, voir à les supprimer. Dans ces conditions, il serait possible alors de ne tenir compte que du flot électro-osmotique, constant en tout point du substrat et qui peut être ainsi déterminé facilement.

III - Techniques de réfrigération.

Quelques rares essais ont consisté simplement à placer l'ensemble de l'appareillage à électrophorèse dans une enceinte réfrigérée ; mais l'on s'aperçut rapidement que ce procédé augmentait au contraire l'évaporation, suivant le phénomène de la « paroi froide ».

Par contre, des études (16) ont montré que le simple fait, de placer le papier filtre entre deux plaques de verre ou de plastique, était une méthode de refroidissement efficace ; cependant ces dispositifs entraînent parfois la production d'un flot électro-osmotique irrégulier, qui nuit à la séparation correcte de substances de mobilités voisines.

Dans un autre domaine, l'utilisation de gaz, tels que l'hélium, comme échangeurs de chaleur s'est avéré peu efficace. Dans des travaux récents, Criddle et collaborateurs (2 - 4), ont proposé un dispositif utilisant un courant d'air réfrigéré. Le refroidissement, produit par l'évaporation de l'éther de pétrole, a été exploité, par Wieme en électrophorèse sur gel d'agar (21), sur gel d'amidon (23) et sur polyacrylamide (22). Cependant, il semble que ce soient les échangeurs de chaleur solides ou liquides qui aient été les plus généralement utilisés. Cremer et Tiselius (5 - I), après avoir disposé la feuille de papier imprégnée d'électrolyte entre deux plaques de verre, plongent l'ensemble dans un liquide organique non miscible à l'eau ; la liaison entre le support et les électrodes est assurée par du papier filtre, imbibé du même électrolyte et contenu dans des tubes de verre. Le liquide organique utilisé dans ces expériences était le chlorobenzène, mais des essais avec le tétrachlorure de carbone (20) se sont avérés tout aussi concluants. Dans le même ordre d'idées, l'emploi de plaques d'aluminium a été proposé par Michl (18).

Actuellement, la plupart des techniques utilisent des blocs métalliques refroidis par un courant liquide (l'eau en général), sur lesquels est déposé le substrat d'électrophorèse isolé du métal par l'intermédiaire d'une feuille de plastique ou d'une plaque de verre. Ce système convient donc parfaitement à l'électrophorèse sur couches minces, étalées précisément sur un tel support isolant. Il s'agit d'ailleurs de la technique que nous avons utilisée au cours de notre expérimentation personnelle.

BIBLIOGRAPHIE (VI)

Certaines références bibliographiques sont mentionnées dans le texte sous forme d'un chiffre arabe, suivi d'un chiffre romain, par exemple 6-V, 4-II, 1-VI, etc ... ; il s'agit de travaux déjà cités dans un chapitre précédent. Dans ce cas :

- le chiffre I correspond à l'introduction,
- les chiffres II à VII correspondent respectivement aux chapitres I à VI.

-
- 1 - AUDUBERT R. et DE MENDE S., «The Principles of Electrophoresis», Hutchinson London, 1959.
 - 2 - CRIDDLE W.J., MOODY G.J. et THOMAS J.D.R., Proc. S.A.C. (Soc. Anal. Chem.) Conf. Nottingham Engl., 1965, p 135, discussion 141.
 - 3 - CRIDDLE W.J., MOODY G.J. et THOMAS J.D.R., Analyst. London, 1969, 94 (1119), 461.
 - 4 - CRIDDLE W.J. et THOMAS J.D.R., J. Chromatog., 1966, 24 (I), 112.
 - 5 - DAUPHIN J., ANDRAUD G. et BERGER J.A., «Lyon Pharmaceutique», 1956, N° 7 spécial, 137 (Congrès Soc. Pharm. : 11-12 Mai 1956.)
 - 6 - DURRUM E.L., J. Colloid. Sci., 1951, 6, 274.
 - 7 - KOWALCZYK J., Wiadomosci Chem., 1963, 17 (12), 703.
 - 8 - KOWALCZYK J., Chem. Anal. (Warsaw), 1963, 8 (5), 659.
 - 9 - KOWALCZYK J., Chem. Anal. (Warsaw), 1963, 8 (6), 823 et 835.
 - 10 - KOWALCZYK J., Chem. Anal. (Warsaw), 1964, 9 (I), 21 et 29.
 - 11 - KOWALCZYK J., Chem. Anal. (Warsaw), 1964, 9 (2), 213.
 - 12 - KOWALCZYK J., Chem. Anal. (Warsaw), 1964, 9 (5), 891 et 899.
 - 13 - KOWALCZYK J., J. Chromatog., 1964, 14, 411.
 - 14 - KOWALCZYK J., Chem. Anal. (Warsaw), 1965, 10 (1), 29.
 - 15 - KOWALCZYK J. et CZAPLINSKI A., Chem. Anal. (Warsaw), 1964, 9 (6), 1021.
 - 16 - LEDERER M. et WARD F.L., Australian J. Sci., 1951, 13, 114.
 - 17 - MACHEBOEUF M., REBEYROTTE P., DUBERT J.M. et BRUNERIE M.,

«Microélectrophorèse sur papier» (Paris 1954).

18 - MICHL H., Monatsh. Chem., 1952, 83, 737.

19 - POHLIT W. et SCHITTKO H., Kolloid. Z., 1958, 156, 73.

20 - SMITH J.D. et MARKHAM R., Nature, 1952, 168, 406.

21 - WIEME R.J., Clin. Chim. Acta, 1959, 4, 317 et : «Agar Gel Electrophoresis». Elsevier Amsterdam, 1963, p 309.

22 - WIEME R.J., Proc. 10ème Bruges Symp. Prot. Biol. Fluids, 1962, H. Peeters (Ed.). Elsevier Amsterdam, 1963, p. 309.

23 - WIEME R.J., Ann. N. Y. Acad. Sci., 1964, 121, 366.

24 - WUNDERLY C., «Die Papierelektrophorese» (H.R. Sauerlander & Co., Aarau & Frankfurt a M, 1959).

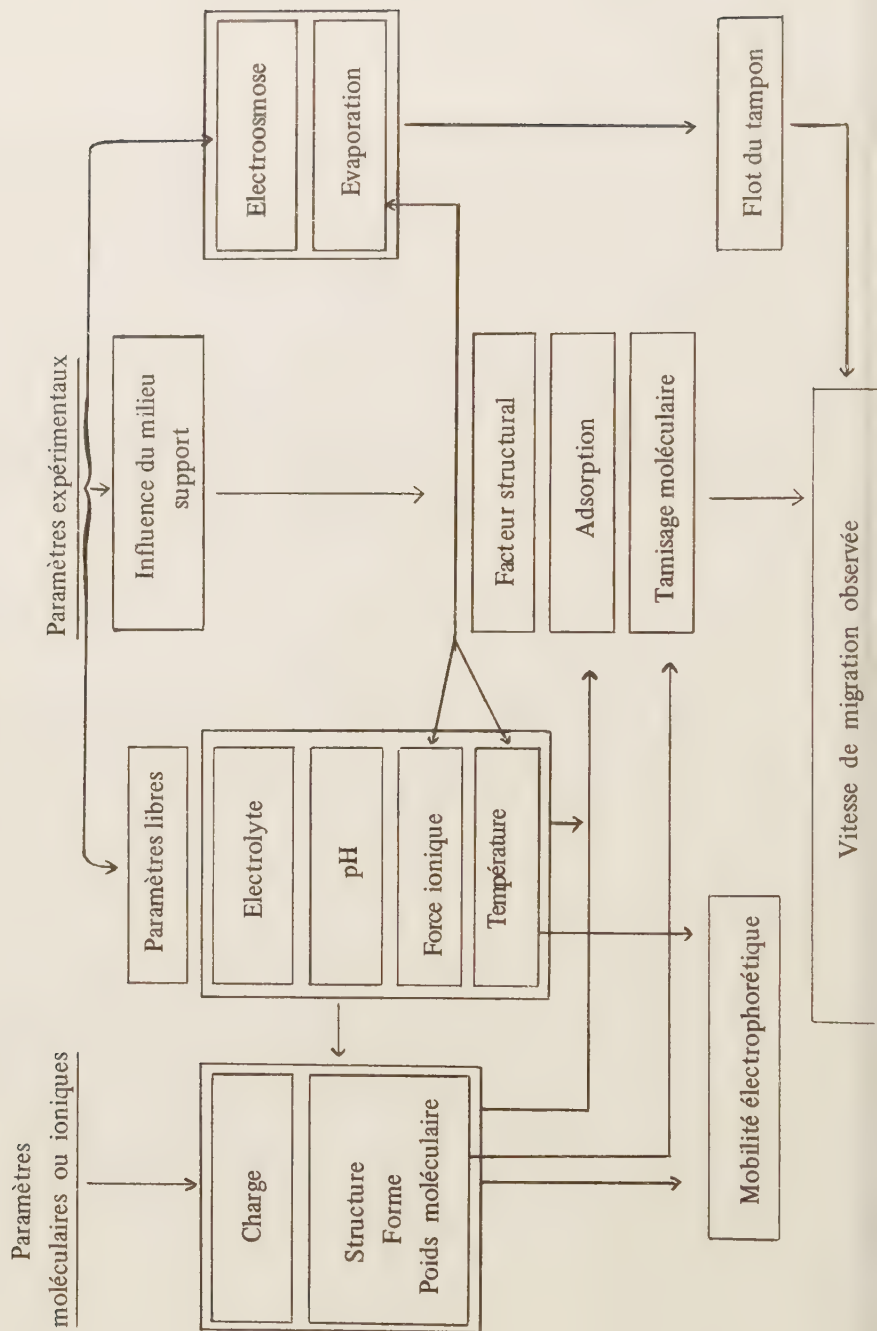
CHAPITRE VI

EXPRESSION DES MOBILITES ELECTROPHORETIQUES SUR SUPPORT.

A partir des très nombreuses données de la littérature, nous nous sommes efforcés dans les chapitres précédents de mettre en évidence et d'analyser, aussi complètement que possible, les multiples facteurs susceptibles d'influencer la migration électrophorétique. Nous avons classé de façon schématique, dans le tableau IV, les différents paramètres qui interviennent dans cette migration et dont on doit tenir compte dans l'expression des mobilités électrophorétiques sur support.

Bon nombre d'auteurs se sont efforcés d'évaluer avec précision les mobilités électrophorétiques, à partir de vitesses de migration obtenues expérimentalement. Notre étude bibliographique approfondie nous a permis cependant de constater l'extrême disparité des facteurs de correction, apportés aux mesures expérimentales. Nous avons choisi un certain nombre d'exemples qui font ressortir précisément les difficultés rencontrées et qui soulignent la nécessité d'une distinction précise, entre les concepts de mobilité réelle en milieu liquide et de mobilité apparente ou relative sur un support donné.

TABEAU IV



I - Données bibliographiques.

Il convient de signaler en premier lieu les tentatives effectuées, pour comparer les mobilités obtenues en milieu liquide et les mobilités observées sur des substrats variés et en particulier le papier. Elles consistent la plupart du temps à trouver, pour les mobilités sur support, un facteur de correction valable, permettant d'obtenir les mobilités réelles. C'est ainsi que Kunkel et Tisélius (15 - I.), dès 1951, ont publié une étude comparative des mobilités de l'albumine humaine, obtenues d'une part sur papier imprégné de tampon barbitol et d'autre part en milieu liquide constitué par le même tampon. Les recherches approfondies d'Audubert et de Mende (1 - VI.), sur l'influence du substrat en électrophorèse sur support, leur ont permis de montrer qu'il existait un rapport constant, entre les mobilités sur papier et les mobilités en milieu liquide, pour des ions minéraux tels que Ag^+ , Cd^{2+} , Ca^{2+} et Cu^{2+} . Plus récemment encore (7), l'utilisation d'un facteur de correction a été proposée, pour déterminer les mobilités réelles de micelles colloïdales, à partir des mobilités expérimentales obtenues sur papier.

Mis à part ces quelques exemples, on est bien forcé de constater cependant, que la plupart des expérimentateurs se contentent le plus souvent d'effectuer leurs corrections, en tenant compte soit du flot du tampon, soit de l'influence globale des différents facteurs propres à l'électrophorèse sur support. Dans des travaux récents sur la séparation d'éléments transuraniens, Clanet et collaborateurs (3 - V.) ont exprimé des valeurs de mobilités pour une température donnée et corrigée uniquement en fonction du flot du tampon. Gustiniani et collaborateurs (11 - V.) effectuent des corrections similaires pour exprimer les mobilités de complexes organo-métalliques. La détermination du flot du tampon a permis également à Whitehead (35 - V.) de calculer, avec une assez bonne précision, les mobilités de plusieurs acides aminés. Dans une étude sur la migration d'ions ammonium aliphatiques, Edward et Crawford (9 - IV.) font intervenir de plus un facteur structural ; ils constatent, que les mobilités d'ions de petites dimensions correspondent assez bien avec les valeurs calculées, mais que, pour des molécules plus volumineuses, des écarts importants sont observés et pourraient être attribués sans doute à des phénomènes d'adsorption. Lahiri et Mukherjee (2 - 4) ont effectué des corrections identiques, sur des

mobilités d'ions minéraux obtenues sur papier. Un autre mode d'expression des mobilités semble de plus en plus utilisé ; il s'agit de mobilités relatives, définies comme le rapport de la mobilité de l'ion à étudier d'une part à celle d'un ion de référence convenablement choisi d'autre part. Kunkel et Trautman (13 - IV.) avaient recommandé déjà, en 1959, de considérer plutôt l'électrophorèse sur support comme une méthode relative dans la détermination des mobilités. Plus récemment, Jokl (1.) a établi précisément une équation permettant le calcul de mobilités relatives, par rapport à l'ion tétraéthylammonium pris comme référence.

Des travaux similaires ont été réalisés par Edward et Waldron-Edward (6 - II.) sur des ions organiques variés, en utilisant deux ions de référence : l'ion butylammonium pour les cations et l'ion picrate pour les anions. Ces auteurs tiennent compte également de l'influence des phénomènes d'adsorption, en introduisant un facteur de correction déterminé par chromatographie. Ces quelques exemples suffisent à souligner l'extrême diversité des corrections , apportées aux migrations observées expérimentalement sur support. Ils font ressortir néanmoins le souci constant de certains expérimentateurs, en vue de l'obtention de données correctes, reproductibles et d'interprétation aisée. Malheureusement, il n'en est pas toujours ainsi et de nombreux résultats sont fréquemment publiés, sans un contrôle suffisant des facteurs fondamentaux et sans une définition précise des conditions expérimentales. L'expression des mobilités électrophorétiques reste donc le plus souvent imprécise et sans aucune mention de corrections éventuelles.

II - Mobilités apparentes, mobilités relatives.

Il importe de définir tout d'abord le concept de mobilité réelle. Du point de vue physico-chimique, la mobilité électrophorétique réelle d'une substance donnée peut être considérée comme une constante physique spécifique, qui ne doit être fonction que de la nature et des propriétés de cette substance. Aussi peut-on concevoir aisément l'extrême difficulté d'une détermination exacte des mobilités réelles, par électrophorèse sur support. Le nouveau concept de mobilité apparente s'impose logiquement, en électrophorèse sur support, les mobilités ne doivent pas être considérées comme des constantes spécifiques,

mais comme des valeurs qui dépendent des conditions expérimentales et de la nature du support utilisé. Nous rappellerons à ce sujet les travaux de Dauphin, Andraud et Berger (5 - VI.), analysés au chapitre précédent et qui ont permis à ces auteurs de proposer une expression de la mobilité apparente, pouvant être considérée comme une constante de la substance étudiée, pour un support et un milieu tampon donnés. Nous signalerons également une revue détaillée, se rapportant à ce problème et publiée récemment par Mac Donald (5).

En règle générale, la publication de toute valeur de mobilité devra s'accompagner non seulement d'un exposé détaillé des conditions expérimentales et des corrections apportées aux migrations observées, mais aussi d'une vérification constante du pouvoir adsorbant du support.

Ces précautions sont indispensables, mais il reste encore un certain nombre de paramètres difficilement contrôlables, tels que le degré d'imprégnation liquide du support. En outre, les détails expérimentaux, même minimes, peuvent avoir une grande influence sur les résultats. Il semble donc logique, avec Kunkel et Trautman (13 - IV.), de considérer plutôt l'électrophorèse sur support comme une méthode relative de détermination des mobilités.

En conséquence, il semble que le procédé le plus valable consiste à utiliser un ion de référence convenablement choisi et migrant dans les mêmes conditions expérimentales que l'ion à étudier ; il subira ainsi de façon identique l'influence de la variation éventuelle des paramètres expérimentaux.

La mobilité relative de l'ion étudié s'exprime par le rapport de son déplacement réel au déplacement de l'ion de référence. Cette détermination est extrêmement simple et, comme l'ont souligné Rabaey et Verriest (6), peut être obtenue avec une grande précision.

L'un des principaux avantages de ce procédé est d'éliminer pratiquement l'influence de la température. Par contre, d'autres paramètres doivent être soigneusement contrôlés et en particulier la force ionique, qui doit être maintenue constante pour obtenir des résultats reproductibles.

Compte tenu des considérations précédentes, Wieme (8) a proposé un calcul de mobilités relatives faisant intervenir en outre un facteur de correction, relatif au flot du tampon et obtenu à l'aide de la méthode des indicateurs. Dans

des conditions expérimentales données, si b exprime la distance séparant l'ion de référence et l'indicateur électriquement neutre et x la distance séparant l'ion étudié X du même indicateur, la mobilité u_x de l'ion X est donnée par l'expression :

$$u_x = \frac{x}{b}$$

C'est à cette méthode que nous avons fait appel, dans notre étude expérimentale par électrophorèse sur couches minces, en introduisant de plus un facteur de correction, proposé par divers auteurs (1 - IV, 18 - IV, 6 - II.) et permettant de tenir compte du degré d'adsorption par le support utilisé.

BIBLIOGRAPHIE (VII)

Certaines références bibliographiques sont mentionnées dans le texte sous forme d'un chiffre arabe, suivi d'un chiffre romain, par exemple 6- V, 4-II, 1-VI, etc ... ; il s'agit de travaux déjà cités dans un chapitre précédent. Dans ce cas :

- le chiffre I correspond à l'introduction,
 - les chiffres II à VII correspondent respectivement aux chapitres I à VI.
-

- 1 - JOKL V., J. Chromatog., 1964, 13, 451.
 - 2 - LAHIRI M.M., J. Indian. Chem. Soc., 1965, 42 (12), 843.
 - 3 - LAHIRI M.M. et MUKHERJEE S.K., J. Indian. Chem. Soc., 1967, 44 (11), 980.
 - 4 - LAHIRI M.M. et MUKHERJEE S.K., J. Indian. Chem. Soc., 1968, 45 (12), 1095.
 - 5 - MAC DONALD H.J., «Chromatography», E. Heftmann (Ed.), Reinhold Publ. Corp., New-York, 1961.
 - 6 - RABAEY M. et VERRIEST G., Ann. Soc. Roy. Zool. Belg., 1957-58, 88, 373.
 - 7 - TOKIWA F. et OHKI K., Kolloid. Z - Z. Polym., 1969, 230 (I), 251.
 - 8 - WIEME R.J., «Agar Gel Electrophoresis, Techniques, Applications», Arscia Brussels, 1959.
-

CHAPITRE VII

ETUDE DE LA STABILITE DES COMPLEXES

PAR ELECTROPHORESE SUR PAPIER

Consacrées à l'étude des liquides biologiques et tout particulièrement du sérum sanguin, les premières applications de l'électrophorèse furent essentiellement d'ordre analytique (5 - I, 6 - I, 30 - I.). Le milieu support le plus couramment utilisé fut incontestablement le papier, mais progressivement d'autres substrats ont fait leur apparition tels que les gels d'agar, d'amidon et de polyacrylamide.

Initialement mises au point en vue de la séparation de macromolécules de type protéinique, ces techniques de fractionnement ont été appliquées ensuite à des molécules plus petites, d'espèces chimiques extrêmement variées (16 - I, 55) : acides organiques, hydrates de carbone, composés azotés (amines, acides aminés, peptides), alcaloïdes, stéroïdes, colorants, ions minéraux (13) etc ... Plus récemment, l'électrophorèse fut employée pour le fractionnement des terres rares (4, 5, 20, 21, 49, 80, 89, 92, 93), des éléments actinides et lanthanides (11, 12, 35, 52), ainsi que de mélanges de complexes variés (15, 16, 26, 64, 70, 77). En ce qui concerne les ions minéraux en particulier, il convient de souligner que l'amélioration des séparations peut être souvent obtenue en utilisant des agents complexants convenables, ajoutés à l'électrolyte de fond (25, 27, 50, 72, 95, 97). Signalons à ce sujet les travaux de Strain et Sullivan (87), qui dès 1951

recommandaient déjà l'emploi des acides lactique, tartrique, citrique ou de l'E.D.T.A. En outre, l'électrophorèse est couramment mise en œuvre tant en radiochimie (1 - 3, 17, 31, 36, 39, 69, 75, 79, 82, 83, 90), qu'en chimie minérale et organique, en vue du contrôle des produits réactionnels (58) et d'études cinétiques de réactions (29) ou d'échanges (100).

L'électrophorèse ne se limite donc pas à une simple technique de fractionnement ; en ce qui concerne tout particulièrement les électrolytes faibles, elle est susceptible d'apporter des informations précises sur la charge et la structure ionique des composés en solution (18, 19, 23, 24, 28, 30, 32, 34, 37, 38, 42, 43, 57, 60, 61, 65, 68, 71, 73, 76, 85, 86.), de même que sur la stabilité des complexes. Il convient de rappeler que les premières études de ce type ont été réalisées en milieu liquide et ont porté essentiellement sur les macromolécules protéiniques: Dès 1942, en effet, Longsworth et Mac Innes (62) ont étudié les interactions entre l'ovalbumine et l'acide ribonucléique. Par la suite, d'autres auteurs (6, 7, 9, 10, 74, 88) ont envisagé les réactions entre les protéines et des composés chimiques plus simples, tels que les ions chlorures et le méthyl-orange (6, 10.).

Travaillant sur la lactoglobuline et l'albumine bovine, Longsworth et Jacobsen (63) ont tracé des courbes, représentant les variations de charge en fonction des mobilités électrophorétiques à différents pH. Des études du même genre ont été réalisées par Velick (91) en ce qui concerne l'aldolase et par Rao (78) et Lal (53) en ce qui concerne l'albumine sérique.

Les premiers travaux, concernant la complexation de cations métalliques par les protéines, ont été effectués par Schilling (81), qui a étudié notamment par électrophorèse les complexes de Cd^{2+} , avec trois espèces de protéines sériques. En combinant les équations d'action de masse et les données de Longsworth et Jacobsen, ils ont calculé des constantes d'association protéines - Cd^{2+} . En reprenant par électrophorèse sur papier les travaux de Schilling, Waldmann-Meyer a pu calculer les constantes d'association entre l'albumine sérique d'une part et d'autre part le proton et les cations Cd^{2+} et Zn^{2+} (32 - V, 28 - IV, 94.).

Difficilement réalisable à l'aide de l'électrophorèse en milieu liquide, l'étude des composés de faible poids moléculaire a connu de ce fait un développement plus tardif. La plupart des travaux effectués concernent l'influence de certains paramètres sur les déplacements ioniques et en particulier

le pH et la concentration en agent complexant, ajouté à l'électrolyte de fond. Alors que beaucoup d'auteurs se sont limités le plus souvent à préciser les meilleures conditions de séparation possibles, d'autres, moins nombreux, ont tenté d'orienter leurs recherches vers la détermination de la stabilité des complexes étudiés.

Les premières considérations théoriques, relatives à l'influence du pH de la solution tampon sur la mobilité U d'un électrolyte faible, sont dues à Consden, Gordon et Martin (22). Prenant l'exemple d'un acide faible HA, ils ont utilisé l'équation suivante :

$$U = \frac{u_A \cdot K_A}{|H^+| + K_A}$$

dans laquelle K_A correspond à la constante de dissociation de l'acide HA et u_A à la mobilité de l'anion A^- conjugué. Cette relation leur a permis d'envisager la possibilité de séparation de deux acides faibles de pK_A différents.

Des études théoriques similaires, effectuées par Korösy (51) et par Wetzel et Voigt (99), concernent l'influence de la concentration en agent complexant sur les mobilités de certains anions.

Du point de vue expérimental, il faut signaler des essais de détermination des points isoélectriques de complexes, en fonction de la concentration en agent complexant de l'électrolyte tampon ; les travaux de Kraus et Smith (14 - I) ont porté sur les complexes chloromercurate, ceux de Alberty et King (8) et de Lederer et Ward (59) sur les complexes halogénés du cadmium. Signalons enfin les recherches effectuées sur la migration des ions Fe^{3+} en présence de thiocyanate (54, 59), ainsi que du Po^{IV} (56) en solution chlorhydrique.

Les premiers travaux réalisés par électrophorèse sur papier, en vue d'obtenir des données plus précises sur les constantes de dissociation des complexes en solution, ne datent que d'une dizaine d'années. C'est ainsi que Werum, Gordon et Thornburg (98) ont obtenu des valeurs de pK_A approchées

pour quelques acides aminés ; ils déterminent les mobilités à trois valeurs de pH, correspondant respectivement à une ionisation négligeable, partielle et complète du composé. Cette méthode suppose au départ une connaissance approximative du pK_A , afin de choisir correctement les valeurs de pH.

Jercan et Popa (40) déterminent les constantes d'instabilité des complexes des lanthanides avec le CDTA (acide cyclo-hexane, 1, 2, diamino NNN' N', tétra-acétique), en utilisant une expression simple, qui dérive de la définition même de la constante de dissociation.

Il est à noter que les calculs précédents ne sont valables, que si les complexes étudiés sont très stables, bien définis et ne comportent en particulier qu'un seul degré de dissociation. En ce qui concerne les complexes successifs, pouvant exister entre un ion donné et l'agent complexant, Biernat (14) a proposé une méthode de détermination plus générale ; les calculs peuvent être simplifiés, si l'on connaît expérimentalement la mobilité de l'ion métallique libre et celle du complexe le plus élevé, obtenu en présence d'un grand excès d'agent complexant ; une troisième mobilité connue correspond à celle du complexe de charge nulle. Les constantes des complexes intermédiaires peuvent être obtenues plus simplement par des méthodes graphiques.

Quelques auteurs ont publié également des relations entre mobilités de zone et concentration en ion hydrogène ou en agent complexant. A partir des courbes représentatives obtenues, ils déterminent les constantes de dissociation de différentes espèces chimiques, telles que les acides faibles (34 - V.) et les complexes entre cations métalliques bivalents et acides aminés (41). En se basant sur la loi de Stokes, Kiso (44 - 48) a proposé une équation théorique, permettant des déterminations similaires, en tenant compte de divers facteurs affectant la mobilité de zone (44). Par analogie avec certains procédés de déterminations spectrophotométriques des constantes d'équilibre, dont la méthode de Stearns et Wheland (84) et celles utilisant les propriétés de la relation homographique, il est facile d'obtenir, en partant de l'équation de Consden, Gordon et Martin par exemple, les relations suivantes :

$$\frac{1}{U} = \frac{|H^+| + K_A}{u_A \cdot K_A} \quad \text{soit} \quad \frac{1}{U} = \frac{|H^+|}{K_A \cdot u_A} + \frac{1}{u_A}$$

En représentant graphiquement $\frac{1}{U}$ en fonction de la concentration en protons, on obtient ainsi une droite de pente $\frac{1}{K_A \cdot u_A}$ et d'ordonnée à l'origine $(1 / u_A)$, permettant une détermination aisée de la constante de dissociation K_A .

Ces données bibliographiques et ces études théoriques seront reprises et développées dans la seconde partie de notre travail, consacrée à la détermination de la stabilité des complexes en solution par électrophorèse sur couches minces.

BIBLIOGRAPHIE (VIII)

Certaines références bibliographiques sont mentionnées dans le texte sous forme d'un chiffre arabe, suivi d'un chiffre romain, par exemple 6-V, 4-II, 1-VI, etc ... ; il s'agit de travaux déjà cités dans un chapitre précédent. Dans ce cas :

- le chiffre I correspond à l'introduction.
 - les chiffres II à VII correspondent respectivement aux chapitres I à VI.
-

- 1 - ADLOFF J.P. et BACHER M., J. Chromatog., 1962, 9, 231.
- 2 - ADLOFF J.P. et BERTRAND R., J. Electroanal. Chem., 1963, 5, 461.
- 3 - AITZETMUELLER K., BUCHTELA K. et GRASS F., J. Chromatog., 1966, 22, 431.
- 4 - AITZETMUELLER K., BUCHTELA K. et GRASS F., Anal. Chim. Acta, 1967, 38 (12), 249.
- 5 - AITZETMUELLER K., BUCHTELA K., GRASS F. et HECHT F., Mikrochem. Ichooanal. Acta, 1964, 6, 1089.
- 6 - ALBERTY R.A., J. Am. Chem. Soc., 1950, 72, 2361.
- 7 - ALBERTY R.A., J. Phys. Colloid. Chem., 1950, 54, 47.
- 8 - ALBERTY R.A. et KING E.L., J. Am. Chem. Soc., 1951, 73, 517.
- 9 - ALBERTY R.A. et MARVIN H.H., J. Am. Chem. Soc., 1951, 73, 3220.
- 10 - ALBERTY R.A. et NICHOL J.C., J. Am. Chem. Soc., 1948, 70, 2297.
- 11 - BAECHMANN K., Radiochim. Acta, 1965, 4 (3), 124.
- 12 - BAECHMANN K., Radiochim. Acta, 1966, 6, 62.
- 13 - BAILEY R.L. et YAFFE L., ds «Chromatographic Reviews» Vol. 3 (M. Lederer Ed.), 1961, p 158.
- 14 - BIERNAT J., Roczniki Chemii Ann. Soc. Chim. Polonorum, 1964, 38, 343.
- 15 - BLASIUS E. et BILAL B.A., J. Chromatog., 1965, 18, 134.
- 16 - BLASIUS E. et PREETZ W., Z. Anorg. Allgem. Chem., 1965, 335 (I-2), I et 16.
- 17 - BUCHTELA K., Allgem. Pratkchem. (Wien), 1967, 11, 353.

- 18 - CASSOL A. et BARBIERI R., Ann. Chim. (Rome), 1965, 6, 606.
- 19 - CASSOL A., MAGON L. et BARBIERI R., J. Chromatog., 1965, 19, 57.
- 20 - CHUN CHANG et PO SZU LIN, Chemistry (Taipei), 1962, p 1.
- 21 - CLARENCE J., Commis. Energ. At. (Fr.) Rapp. 2877, 1966, 92 pp.
- 22 - CONSDEN R., GORDON A.H. et MARTIN A.J.P., Biochem. J., 1946, 40, 33.
- 23 - CZAKIS—SULIKOWSKA D.M., Rocznik. Chem., 1964, 38 (10), 1435.
- 24 - CZAKIS—SULIKOWSKA D.M., Zeszyty Nauk. Politechn. Lodz Chem., 1965, 16 , 23.
- 25 - DAS BISWAS S. et DEY A.K., J. Indian Chem. Soc., 1965, 42, (11), 763.
- 26 - DAS BISWAS S., GARGV C. et DEY A.K., Chim. Anal. (Paris), 1966, 48 (2), 96.
- 27 - DE VRIES G., SCHUTZ G.P. et VAN DALEN E., J. Chromatog., 1964, 13, 119.
- 28 - DROZDOVAN T.U., KRAVSTOVA R.P. et TOBELKO K.I., Izvest. Akad. Nauk. S.S.S.R. Otd. Khim. Nauk., 1962, p 38.
- 29 - GENET M. et FERRADINI C., J. Chromatog. 1968, 37, 527.
- 30 - GODEONOV L.I., LEBEDEV I.A., STEPANOV A.V. et SHALINETS A.B. Khim. Transuranovykh Oskolochnykh Elem. Akad. Nauk. S.S.S.R. Otd. Obsh. Tekh. Khim., 1967, p 102.
- 31 - GOPAL N.G.S., Indian J. Chem., 1969, 7 (6) 618.
- 32 - GORSKI B. et KOCH H., J. Inorg. Nucl. Chem., 1969, 31 (11), 3565.
- 33 - GRIGOREVA U.V. et TSIMBLER T.S., Zh. Neorgan. Khim., 1968, 2, 492 et 498.
- 34 - GUBERNIEVA L.M. et SILAEV A.B., Antibiotiki, 1964, 9 (8), 716.
- 35 - GUIDES DE CARVALO R.A., J. Chromatog., 1965, 18, 381.
- 36 - HOYE A., J. Chromatog., 1967, 28, 379.
- 37 - HURNICK B., Roczniki Chemii, 1965, 39, 137.
- 38 - IDELSON M., KARADY R.I. et MARK B.H., Proc. 9ème Conf. Int. Coordin. Chem., S^t—Moritz, Bad., 1965—1966, p 292.
- 39 - IMRISOVA D. et KNOBLOCH V., Collection Czech. Chem. Commun., 1963, 28, 331.
- 40 - JERCAN E. et POPA G., J. Chromatog., 1969, 42, 89.
- 41 - JOKL V., J. Chromatog., 1964, 14, 71.

- 42 - JOSEFOWICZ E., KWASIK T. et MASLOWSKA J., Papier présenté au XIX Congrès International de Chimie pure et appliquée, Londres, 10-17 juillet 1963.
- 43 - JOZEFOVICZ E. et MASLOWSKA J., Zeszyty Nauk. Politech. Lodzkiej. Chem., 1963, 13, 13.
- 44 - KISO Y., J. Sci. Hiroshima Univ. Ser. A 11, 1963, 27, (1), 17.
- 45 - KISO Y., J. Sci. Hiroshima Univ. Ser. A 11, 1963, 27 (1), 23.
- 46 - KISO Y., Kagaku n° Ryoki, 1969, 23 (2), 181 et 1969, 23 (3), 283.
- 47 - KISO Y., KOBAYASHI M., KITAOKA Y., KAWAMOTO K. et TAKADA J., J. Chromatog., 1968, 36, 215.
- 48 - KISO Y., YAMADA Y., YAMAMOTO M. et SHINAGAWA M., Bull. Soc. Chim. Japan, 1965, 38 (5), 695.
- 49 - KNOBLOCH V. et TE-HOUTEN, Sostova Stroenija Veshchestv, Akad. Nauk. S.S.S.R. Inst. Geokhim.i Analit. Khim., 1965, p 222.
- 50 - KORCHEMNAYA E.K. NAUMOVA U.I. et ERMAKOV A.N., Zh. Anal. Khim., 1969, 24 (3) 342.
- 51 - KOROSY F., Magy. Kem. Folyoirat., 1954, 60, 101.
- 52 - KRAAK W. et WALSH G.D., J. Chromatog., 1965, 20, 197.
- 53 - LAL H. et RAO N.M.S., J. Am. Chem. Soc., 1957, 79, 3050.
- 54 - LEDERER M., Nature, 1951, 167, 864.
- 55 - LEDERER M., «Progrès récents de la Chromatographie», 2ème partie : «Chimie Minérale» Hermann, Paris, 1952.
- 56 - LEDERER M., Thèse, Paris, 1954.
- 57 - LEDERER M. et MAZZEI M., J. Chromatog., 1968, 35, 201.
- 58 - LEDERER M. et SHUKLA S.K., J. Chromatog., 1961, 6, 249.
- 59 - LEDERER M. et WARD F.L., Anal. Chim. Acta, 1952, 6, 355.
- 60 - LEWANDOWSKI A. et HURNICK B., Roczniki Chem., 1964, 38 (2), 195.
- 61 - LEWANDOWSKI A. et HURNICK B., Roczniki Chem., 1964, 38 (33), 57.
- 62 - LONGSWORTH L.G. et MAC INNES D.A., J. Gen. Physiol., 1942, 25, 507.
- 63 - LONGSWORTH L.G. et JACOBSEN C.F., J. Phys. et Colloid. Chem., 1949, 53, 126.

- 64 - MAC CREARY T.W., MAIER R.H. et KNESEK B.D., J. Chromatog., 1964, 14, 544.
- 65 - MARCU G., Analele Univ. C.I. Parhon. Bucuresti, 1965, 1, 9.
- 66 - MARCU G. et MARGU G.H., Rev. Roum. Chim., 1967, 12, 957.
- 67 - MARCU G. et SAMOCHOCKA K., Studia. Univ. Babes. Bolyai. Ser. I, 1965, 2, 71.
- 68 - MARCU G. et SAMOCHOCKA K., Studia. Univ. Babes. Bolyai. Ser. Chem. 11, 1966, I, 15.
- 69 - MARCU G. et TOMUS M., Studia. Univ. Babes. Bolyai. Ser. Chem. 13, 1968, 2, 11.
- 70 - MASLOWSKA J., Zeszyty Politech. Lodz Chem., 1961, 10, 57.
- 71 - MAZZEI M. et LEDERER M., J. Chromatog., 1968, 37, 292.
- 72 - MERZ E., Z. Anal. Chem., 1965, 211 (5), 331.
- 73 - MORVAY J., KOSEPEŠY G. et KOCSIS G., Acta Pharm. Hung., 1968, 38 (5), 326.
- 74 - NICHOL J.C., J. Am. Chem. Soc., 1950, 72, 2367.
- 75 - PASTERNAK A., Isotopenpraxis, 1968, 4, 137.
- 76 - PREETZ W. et BLASIUS E., Z. Anorg. Allgem., 1964, 332 (314), 140.
- 77 - RALEA R., GIURGIV D. et FISIL S., Rev. Roumaine Chimique, 1964, 9 (II), 709.
- 78 - RAO N.M.S. et LAL H., J. Am. Chem. Soc., 1958, 80, 3222 et 3226.
- 79 - RIPAN R. et MARCU G., Rev. Chim. (Bucuresti), 1962, 7, 471.
- 80 - SHCHERBACK O.V., Mineral'n Syr'e Moscou Sb., 1961, 3, 35.
- 81 - SCHILLING K., Acta Chem. Scand., 1957, 11, 1103.
- 82 - SHUKLA S.K., BACHER M. et ADLOFF J.P., J. Chromatog., 1963, 10, 93.
- 83 - SHUKLA S.K. et LEDERER M., J. Chromatog., 1962, 9, 255.
- 84 - STEARNS R.S. et WHELAND G.W., J. Am. Chem. Soc., 1947, 69, 2025.
- 85 - STEPANOV A.V. et MARKOVA T.D., Radiokhimiya, 1969, 11 (3), 290.
- 86 - STEPANOV A.V., MAKOROVA T.D., MAKSIMOVA A.M. et SHALINETTS A.B., Radiokhimiya, 1967, 9 (6), 710.
- 87 - STRAIN H.H. et SULLIVAN J.C., Anal. Chem., 1951, 23, 816.
- 88 - SVENSSON H., Acta Chem. Scand., 1948, 2, 841.

- 89 - THOMPSON L.C. et NICHOL J.C., *Inorg. Chem.*, 1963, 2, 841.
- 90 - VAN DIJK H., IJSSELING F.P. et COMAN H., *Anal. Chim. Acta*, 1962
27, 563.
- 91 - VELICK S.F., *J. Phys. et Colloid. Chem.*, 1949, 53, 135.
- 92 - VESELY F., PETRU F. et MADER F., *Chem. Zvesti.*, 1966, 10, 792.
- 93 - VIRTANEN R. et KIVALO P., *Suomen Kemistilihti*, 1968, 7-8, 184.
- 94 - WALDMANN-MEYER H., *Protides Biol. Fluids Proc. Colloq.*, 1959, 7,
25.
- 95 - WENGER P.E., JANSTEIN W.V. et KAPETANIDIS I., *Mikrochim. Ichonanal. Acta*, 1963, p 97.
- 96 - WENGER P.E., KAPETANIDIS I. et JANSTEIN W.V., *Mikrochim. Acta*,
1960, p 961.
- 97 - WENGER P.E., KAPETANIDIS I. et JANSTEIN W.V., *Mikrochim. Acta*,
1962, p 184.
- 98 - WERUM L.M., GORDON H.T. et THORNBURG W., *J. Chromatog.*, 1960,
3, 125.
- 99 - WETZEL K. et VOIGT G., *Z. Phys. Chem.*, 1961, 7, 216.
- 100 - WOLFF C.M. et SCHWING J.P., *Compt. Rend.*, 268 C, 1969, 8, 674 et
id., 15, 1339.
-

DEUXIEME PARTIE

« TRAVAUX PERSONNELS »



Application de l'Electrophorèse sur couches minces à
l'étude de la stabilité des complexes en solution.

La littérature de ces dernières années ne révèle qu'un nombre limité de publications, portant sur l'étude de la stabilité des complexes en solution à l'aide de l'électrophorèse sur papier.

L'électrophorèse sur couches minces n'ayant pas encore, à notre connaissance, été appliquée à ce type de recherches, nous avons préféré utiliser cette méthode pour nos études personnelles. Plusieurs raisons ont guidé notre choix tant sur le plan théorique que sur le plan pratique.

Outre la cellulose en effet, il est possible d'utiliser en couches minces d'autres substrats de nature extrêmement variée, minérale ou organique et en particulier les échangeurs d'ions. De plus, les supports pour couches minces, plaques de verre ou feuilles de plastique, favorisent en cours d'électrophorèse la réfrigération du substrat, phénomène essentiel à l'obtention de résultats reproductibles.

Au cours de nos travaux, seule la poudre de cellulose a été utilisée, de manière à pouvoir contrôler dans un premier temps les résultats obtenus par électrophorèse sur papier. L'étude systématique des divers paramètres, susceptibles d'influencer les migrations ioniques, nous a amenés à établir un protocole expérimental parfaitement défini permettant d'obtenir une mesure correcte des mobilités électrophorétiques. Ce travail préliminaire constitue en fait une base de comparaison essentielle pour l'expérimentation ultérieure de couches minces de nature variée.

D'autre part, avant d'entreprendre une prospection électrophorétique méthodique de divers types de complexes, il nous a paru indispensable de préciser certaines notions fondamentales et d'effectuer quelques mises au point théoriques, nécessaires à l'interprétation des résultats. En nous appuyant sur

les notions de « labilité » des complexes et d'équilibre « dynamique » des systèmes réversibles, nous avons pu donner une définition satisfaisante de la mobilité de zone électrophorétique et démontrer son expression mathématique. Ces raisonnements ont été appliqués ensuite au cas des monoacides faibles, véritables complexes du proton ; la représentation graphique des variations de leur mobilité, en fonction du pH, conduit à une détermination simple de leur pK_A , c'est-à-dire de leur stabilité.

Pour confirmer d'une part ces données théoriques et pour vérifier d'autre part les résultats obtenus par électrophorèse sur papier et publiés antérieurement, nous avons d'abord réalisé un certain nombre d'expériences sur couches minces de cellulose. C'est ainsi que nous nous sommes adressés à différents types d'acides faibles en solution aqueuse, tels que les acides polycarboxyliques et les acides aminés. Enfin, nous avons étudié les complexes citriques de divers cations métalliques et déterminé leurs constantes de stabilité, en considérant qu'il s'agissait de véritables complexes métallo-acides faibles.

CHAPITRE I

GENERALITES

I - Définitions, classifications et notions diverses.

Un complexe, neutre ou ionisé, résulte de l'union de plusieurs ions ou molécules. Cette définition générale s'applique en fait à tous les ions ou molécules en solution, car des ions simples ou « nus » n'existent véritablement qu'en phase gazeuse et à haute température. En solution en effet, la solvation des ions est un phénomène pratiquement constant, quelle que puisse être la solidité des liaisons entre les molécules du solvant et l'ion considéré. C'est ainsi que la formation d'un complexe organo-métallique de type ML_n , dans lequel M représente le cation central et L l'agent complexant ou coordinat, peut être considéré en réalité comme le remplacement de « n » molécules de solvant par « n » molécules L d'agent complexant. Cependant, ce schéma n'est qu'approché et pour des molécules peu dissociées, la quantité d'ions solvatés est faible ; en solution aqueuse par exemple, seuls les ions alcalins et alcalino-terreux existent pratiquement à un degré d'hydratation optimal.

Le nombre de coordination d'un cation métallique M, susceptible de former un complexe de type ML_n avec n coordinats L, est défini par le nombre maximal « n » de coordinats qu'il est susceptible de fixer ; certains ions peuvent présenter plusieurs nombres de coordination caractéristiques. La fixation du coordinat sur l'ion central peut s'effectuer de différentes manières. C'est ainsi qu'on désigne sous le terme de coordinat « unidenté », un coordinat fixé en un seul point au cation métallique (eau, halogénures ...). Par extension, le terme de coordinat « multidenté » est utilisé pour une molécule ou un ion, possédant deux ou plusieurs centres coordinateurs et susceptible de se fixer au cation par

l'intermédiaire de deux ou plusieurs liaisons. Un coordinat multidenté peut éventuellement former avec le métal une structure cyclique ; les complexes ainsi engendrés sont désignés habituellement sous le terme de « chélates » et les coordinats multidentés correspondants « agents chélatants » ou « chélateurs ». Les chélates se caractérisent généralement par une très grande stabilité, tels que ceux obtenus à partir des acides polyamino-carboxyliques (E.D. T.A. , D.T.P.A.) , qui possèdent souvent six atomes donneurs et parfois même plus.

Outre les complexes précédents de type ML_n et désignés généralement sous le terme de complexes « mononucléaires », il convient d'envisager également les complexes « polynucléaires » de type M_mL_n . En ce qui concerne les complexes polynucléaires, leur formation par étapes successives peut aboutir à l'existence de différentes espèces, renfermant un nombre variable m de cations centraux. Aussi, les équations d'équilibre, déduites de la loi d'action de masse, sont-elles parfois très compliquées. Par contre, la formation des complexes mononucléaires se conçoit plus simplement et les étapes successives correspondent à des équilibres régis également par la loi d'action de masse ; il est possible ainsi de définir autant de constantes d'équilibre ou de dissociation K_{c1} , K_{c2} ... K_{cn} , qu'il y a de complexes successifs ML , ML_2 , ML_n . On désigne souvent sous le terme de constante, « globale » ou « cumulative » le produit des constantes successives, tel que :

$$\beta_n = K_{c1} \cdot K_{c2} \dots K_{cn} = \frac{[M][L]^n}{[ML_n]}$$

La constante de dissociation K_c d'un complexe permet de calculer sa concentration à l'équilibre et sa stabilité s'exprime habituellement par la valeur du pK correspondant. La constante de dissociation d'un complexe est définie par le rapport de ses vitesses de dissociation et de formation respectives, mais ne préjuge en rien de la valeur absolue de ces vitesses. C'est ainsi qu'un complexe stable, caractérisé par une valeur élevée de son pK_c , peut avoir des vitesses de dissociation et de formation très grandes, pourvu qu'elles soient suffisamment différentes.

Par contre, la notion de « labilité » d'un complexe, introduite par Taube en 1952 (27) et développée plus récemment par Ringbom (20), est fondée précisément sur la valeur absolue de ces vitesses. Un complexe est « labile » si les liaisons entre l'atome central et les coordinats se rompent et s'établissent à une fréquence élevée. Inversement, un complexe est inerte si ses vitesses de formation et de dissociation sont faibles en valeur absolue, c'est-à-dire si son équilibre de dissociation est atteint très lentement. Les notions de complexes labiles et stables ou de complexes inertes et instables se conçoivent donc parfaitement. Nous citerons l'exemple de l'ion ferricyanure $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, qui se dissocie lentement en milieu acide en Fe^{3+} et HCN et dont l'inertie peut être confondue avec une certaine stabilité, si le temps d'expérience est suffisamment court. Des notions de stabilité et de labilité, en découle une autre très importante : la notion de réactivité des complexes. On admet en général que les molécules neutres réagissent plus lentement que les espèces chargées, de même que les ions à structure complexe par rapport à des ions plus simples. Toutefois, ces considérations n'ont pas de caractère absolu et ne s'appliquent pas à toutes les réactions de complexation (4, 20, 27).

II - Constantes usuelles.

Si l'on considère la réaction suivante, correspondant à la dissociation d'un complexe mononucléaire :



à l'équilibre, la loi d'action de masse s'exprime par :

$$K_{\text{ML}_n} = \frac{[\text{M}] \cdot [\text{L}]^n}{[\text{ML}_n]}$$

où K_{ML_n} représente la constante de dissociation du complexe ML_n et les termes entre crochets les concentrations des constituants, en moles par litre.

Sur le plan thermodynamique, la loi d'action de masse suppose que chaque espèce chimique existant à l'équilibre se trouve dans un état standard idéal irréalisable pratiquement : l'espèce envisagée serait l'unique constituant d'une solution infiniment diluée. Dans le cas habituel de solutions contenant plusieurs constituants, qu'il s'agisse d'ions ou de molécules électriquement neutres, il est nécessaire de tenir compte de leurs interactions propres, ainsi que des phénomènes de solvatation. On est ainsi amené à faire intervenir des coefficients d'activité qui tiennent compte de la nature et de la concentration de toutes les espèces chargées en solution, en utilisant le concept de force ionique précédemment défini. L'expression des constantes de dissociation selon la loi d'action de masse ne serait donc valable que si l'on utilise les activités réelles et non les concentrations des constituants à l'équilibre. Les constantes, exprimées le plus souvent dans la littérature en fonction des concentrations dépendent en fait de la nature du milieu et de la force ionique qui doivent toujours être parfaitement définies. Cependant, l'expression des constantes de dissociation en fonction des concentrations présente un intérêt pratique indéniable ; d'autre part, si les ions H^+ interviennent dans l'équilibre considéré, les valeurs de pH, mesurées par potentiométrie, que l'on fait intervenir, expriment en réalité l'activité des protons. On est amené ainsi à utiliser des constantes « mixtes » de dissociation, où interviennent d'une part l'activité des ions H^+ et d'autre part les concentrations réelles des autres constituants. Il est donc possible d'utiliser trois types de constantes d'équilibre : constantes d'activité, constantes de concentration, et, constantes mixtes. Fort heureusement dans de nombreux cas, l'influence sur un équilibre des variations de la force ionique et de diverses réactions secondaires est souvent minime et il est possible d'utiliser des expressions mathématiques relativement simples. C'est ainsi que Schwarzenbach (22) a introduit en complexométrie la notion de constante « apparente », qui exprime le degré de dissociation ou la stabilité d'un complexe, dans un milieu et dans des conditions expérimentales données.

Généralisant le raisonnement de Schwarzenbach, Kolthoff puis Ringbom (18, 19) ont proposé l'utilisation d'une nouvelle constante appelée constante « conditionnelle » de stabilité, tenant compte, comme son nom l'indique, des conditions expérimentales et qui représente en réalité l'inverse de la constante de dissociation. Elle s'exprime par :

$$K' = K_{M', L'} = \frac{[ML]}{[M'] [L']}$$

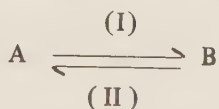
où $[M']$ désigne la concentration totale en cation métallique, n'ayant pas réagi avec l'agent complexant L et existant en solution sous toutes les formes possibles. De même $[L']$ désigne à l'équilibre la concentration totale de l'agent complexant non lié au cation, sous toutes les formes possibles. Dans nos travaux expérimentaux, nous avons utilisé le plus souvent des constantes mixtes, où intervient l'activité des ions H^+ , mesurée par potentiométrie ; les conditions expérimentales ayant été définies avec le maximum de précisions possibles, il s'ensuit que les constantes que nous avons mesurées peuvent être assimilées à des constantes mixtes apparentes ou conditionnelles.

CHAPITRE II

ETUDE THEORIQUE DES COMPLEXES LABILES

I - Théorie générale.

Considérons le cas général de deux espèces chimiques chargées A et B, en solution à des concentrations respectives C_A et C_B et susceptibles de se transformer mutuellement l'une en l'autre, suivant les réactions inverses (I) et (II) :



Supposons qu'un certain volume V de solution soit soumis à l'influence d'un champ électrique unité, au cours d'une migration électrophorétique et que les mobilités respectives de A et de B, désignées par u_A et u_B , soient différentes. Considérons un élément de volume de cette solution, d'aire de section droite unité et d'épaisseur dx. A l'intérieur de ce volume, deux phénomènes vont se produire simultanément (figure I) :

- un phénomène de migration électrophorétique, pour chacune des espèces chimiques considérées,
- un phénomène de transformation chimique d'une espèce en l'autre et vice-versa.

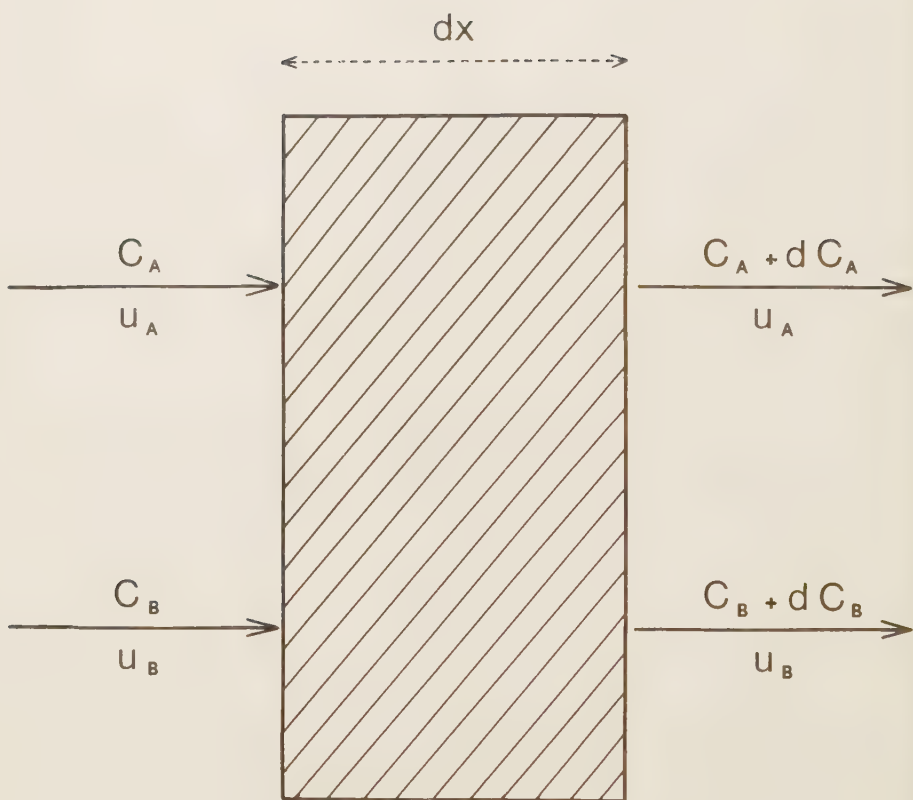


FIGURE 1

Appliquons le principe de conservation de la matière à l'intérieur de l'élément de volume d'épaisseur dx , pendant le temps dt et établissons dans un premier temps le bilan d'entrée et de sortie des molécules de l'espèce A pendant ce temps dt :

Il entre $u_A C_A dt$ molécules de A et il en sort $u_A \left[C_A + \frac{\partial C_A}{\partial x} dx \right] \cdot dt$.

L'excédent de sortie est donc $u_A \frac{\partial C_A}{\partial x} dx \cdot dt$.

Il en est de même pour l'espèce B : $u_B \frac{\partial C_B}{\partial x} dx \cdot dt$.

A l'intérieur de l'élément d'épaisseur dx , il ne peut se produire que des transformations de A en B ou de B en A et l'excédent de sortie global provient des variations totales, qui se produisent dans l'élément de volume considéré. On a donc :

$$\left[\frac{\partial C_A}{\partial t} + \frac{\partial C_B}{\partial t} \right] dx \cdot dt = - \left[u_A \frac{\partial C_A}{\partial x} + u_B \frac{\partial C_B}{\partial x} \right] dx \cdot dt$$

expression qui conduit à l'équation fondamentale suivante :

$$u_A \cdot \frac{\partial C_A}{\partial x} + u_B \cdot \frac{\partial C_B}{\partial x} + \frac{\partial C_A}{\partial t} + \frac{\partial C_B}{\partial t} = 0 \quad (I)$$

Cette équation constitue une relation générale, valable pour l'étude des migrations électrophorétiques de composés chimiques en équilibre et susceptibles de se transformer mutuellement l'un en l'autre. Elle s'applique donc aussi bien aux composés labiles qu'aux composés inertes ; dans le cadre de notre étude, nous ne serons amenés à considérer que le cas des composés labiles.

II - Etude des complexes labiles.

A - Application de la notion d'équilibre dynamique à l'expression de la mobilité électrophorétique.

Reprenons la théorie générale précédente, mais supposons en outre que les réactions simultanées (I) et (II) soient suffisamment rapides : les composés A et B sont dits en « équilibre dynamique ». A l'équilibre, les vitesses de transformation réciproque d'une espèce en l'autre sont égales et l'on a :

$$k_A C_A = k_B C_B$$

k_A et k_B étant les constantes de vitesse des deux réactions. En outre : la concentration totale $C = C_A + C_B$

$$\text{donc : } C_A = C \left[\frac{k_B}{k_A + k_B} \right] \quad \text{et} \quad C_B = C \left[\frac{k_A}{k_A + k_B} \right]$$

L'équation fondamentale (I) de la théorie générale précédente peut alors s'écrire :

$$u_A \left[\frac{k_B}{k_A + k_B} \right] \frac{\partial C}{\partial x} + u_B \left[\frac{k_A}{k_A + k_B} \right] \frac{\partial C}{\partial x} + \left[\frac{k_B}{k_A + k_B} \right] \frac{\partial C}{\partial t} + \left[\frac{k_A}{k_A + k_B} \right] \frac{\partial C}{\partial t} = 0$$

$$\text{ou encore : } \frac{\partial C}{\partial x} \cdot \left[\frac{u_A k_B + u_B k_A}{k_A + k_B} \right] + \frac{\partial C}{\partial t} = 0$$

Le rapport constant :

$$\frac{u_A k_B + u_B k_A}{k_A + k_B} = \frac{u_A C_A + u_B C_B}{C_A + C_B} \quad (\text{II})$$

exprime une vitesse ou une mobilité moyenne et, si on le désigne par U , on a :

$$U \frac{\partial C}{\partial x} + \frac{\partial C}{\partial t} = 0 \quad (III)$$

Finalement, on aboutit à la solution :

$$C = f(x - Ut)$$

qui correspond à l'équation d'un mouvement uniforme.

Tout se passe comme si l'ensemble des deux composés A et B se comportait comme une seule espèce chimique homogène et se déplaçait à la vitesse U. Lorsqu'il s'agit de substances, dont l'inertie est assez importante, il est bien évident que la notion de vitesse ou de mobilité moyenne n'a plus la même signification ; en effet, la durée de vie d'une particule dans un état donné devient assez longue, par rapport à la durée de l'électrophorèse et, une fois la migration terminée, il peut arriver que l'étalement des substances considérées soit assez important, pour engendrer un début de séparation.

Le terme U, introduit lors de l'établissement de l'équation (III) et valable pour les composés dits « en équilibre dynamique », s'identifie à la mobilité électrophorétique d'une particule, qui représente la distance parcourue par cette dernière pendant l'unité de temps et dans un champ électrique unitaire, selon :

$$U = \frac{d}{E \cdot T}$$

En considérant toujours les mêmes composés A et B en équilibre dynamique, on peut dire que, pendant la durée totale d'électrophorèse T, chaque particule migre comme une particule A durant le temps t_A et comme une particule B durant le temps t_B . Les temps t_A et t_B dépendent en premier lieu des concentrations respectives de A et de B à l'équilibre. En effet, plus la concentration en A est grande par rapport à celle de B, plus la probabilité est grande pour une particule de se trouver sous la forme A, ce qui correspond, au bout du temps T, à une valeur de t_A d'autant plus grande vis-à-vis de t_B .

En solution diluée, les concentrations de A et de B à l'équilibre peuvent être exprimées par les activités |A| et |B| et l'on peut écrire :

$$\frac{t_B}{t_A} = \frac{|B|}{|A|}, \text{ soit : } \frac{t_B + t_A}{t_A} = \frac{|B| + |A|}{|A|}, \text{ ou } t_A = \left[\frac{|A|}{|A| + |B|} \right] T$$

$$\text{De même : } t_B = \left[\frac{|B|}{|A| + |B|} \right] T$$

Si, dans un milieu déterminé et dans des conditions expérimentales données, les formes A et B migrent dans un champ électrique E, avec les vitesses respectives v_A et v_B , la distance parcourue par l'ensemble des particules pendant la durée T d'électrophorèse, s'exprimera par :

$$d = \left[v_A \cdot \frac{|A|}{|A| + |B|} \cdot T \right] + \left[v_B \cdot \frac{|B|}{|A| + |B|} \cdot T \right]$$

Envisageons maintenant un ensemble de particules, appartenant à un même système en équilibre dynamique et soumis à une électrophorèse sur support ; si au bout du temps T les particules de cet ensemble se trouvent réparties dans une zone déterminée de ce support, il est désormais classique d'exprimer leur mobilité moyenne sous le terme de mobilité de « zone » qui s'écrit :

$$U = \frac{d}{E \cdot T} = \left[u_A \frac{|A|}{|A| + |B|} \right] + \left[u_B \frac{|B|}{|A| + |B|} \right]$$

$$\text{ou : } U = \frac{u_A |A| + u_B |B|}{|A| + |B|}$$

En généralisant à n complexes labiles mononucléaires, de mobilités respectives $u_1, u_2, \dots, u_n, u_o$ désignant la mobilité de l'ion central libre, la mobilité de zone s'écrit alors :

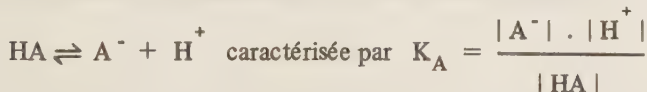
$$U = \frac{u_0 |M| + u_1 |ML| + \dots + u_n |ML_n|}{|M| + |ML| + \dots + |ML_n|}$$

Cette relation est identique à celle obtenue par Kiso (9, 12), qui pour sa démonstration s'est appuyé sur la loi de Stokes.

B - Cas général des monoacides faibles.

Les agents complexants des cations métalliques sont susceptibles également de fixer des ions hydrogènes ; les acides faibles peuvent donc être considérés comme des complexes du proton et les équations d'équilibre des complexes peuvent leur être appliquées.

Soit la réaction de dissociation d'un monoacide faible HA :



La mobilité de zone de cet acide s'exprime par :

$$U = \frac{u_{HA} \cdot |HA| + u_{A^-} \cdot |A^-|}{|HA| + |A^-|}$$

L'acide HA n'étant pas chargé, sa mobilité est nulle et l'expression de U se simplifie selon :

$$U = \frac{u_{A^-} \cdot |A^-|}{|HA| + |A^-|}$$

En remplaçant $|A^-|$ par sa valeur, tirée de l'expression de K_A , la mobilité U s'écrit alors :

$$U = \frac{u_{A^-} \cdot K_A}{K_A + |H^+|}$$

Comme l'a déjà proposé Waldron-Edward (29).

Il est donc possible de calculer les variations de U en fonction du pH. Il est évident aussi que, plus le pH sera faible, plus la mobilité tendra vers la mobilité de HA , c'est-à-dire vers zéro ; de même, plus le pH sera élevé, plus la mobilité tendra vers celle de la base conjuguée A^- . La représentation graphique de U en fonction du pH sera donc comprise entre les valeurs de mobilité $U = 0$ et $U = u_{A^-}$. En posant :

$|H^+| = e^{-2,3 \text{ pH}}$, l'expression de U devient :

$$U = u_{A^-} \cdot \left[\frac{K_A}{K_A + e^{-2,3 \text{ pH}}} \right]$$

L'étude de la dérivée première U' et de la dérivée seconde U'' montre que U' est toujours négative et que U'' s'annule, en changeant de signe, pour $\text{pH} = \text{p}K_A$ et $U = \frac{1}{2} u_{A^-}$.

Si l'on effectue un changement d'axe d'origine Q (figure 2), défini par $Y = U - \frac{u_{A^-}}{2}$ et $X = \text{pH} - \text{p}K_A$, la fonction $U = f(\text{pH})$

est alors représentée par l'expression :

$$U = Y + \frac{u_{A^-}}{2} = u_{A^-} \cdot \left[\frac{K_A}{K_A + e^{-2,3(\text{p}K_A + X)}} \right] = \left[\frac{u_{A^-}}{1 + e^{-2,3X}} \right]$$

soit :

$$Y = \frac{u_{A^-}}{2} \cdot \left[\frac{2}{1 + e^{-2,3X}} - 1 \right]$$

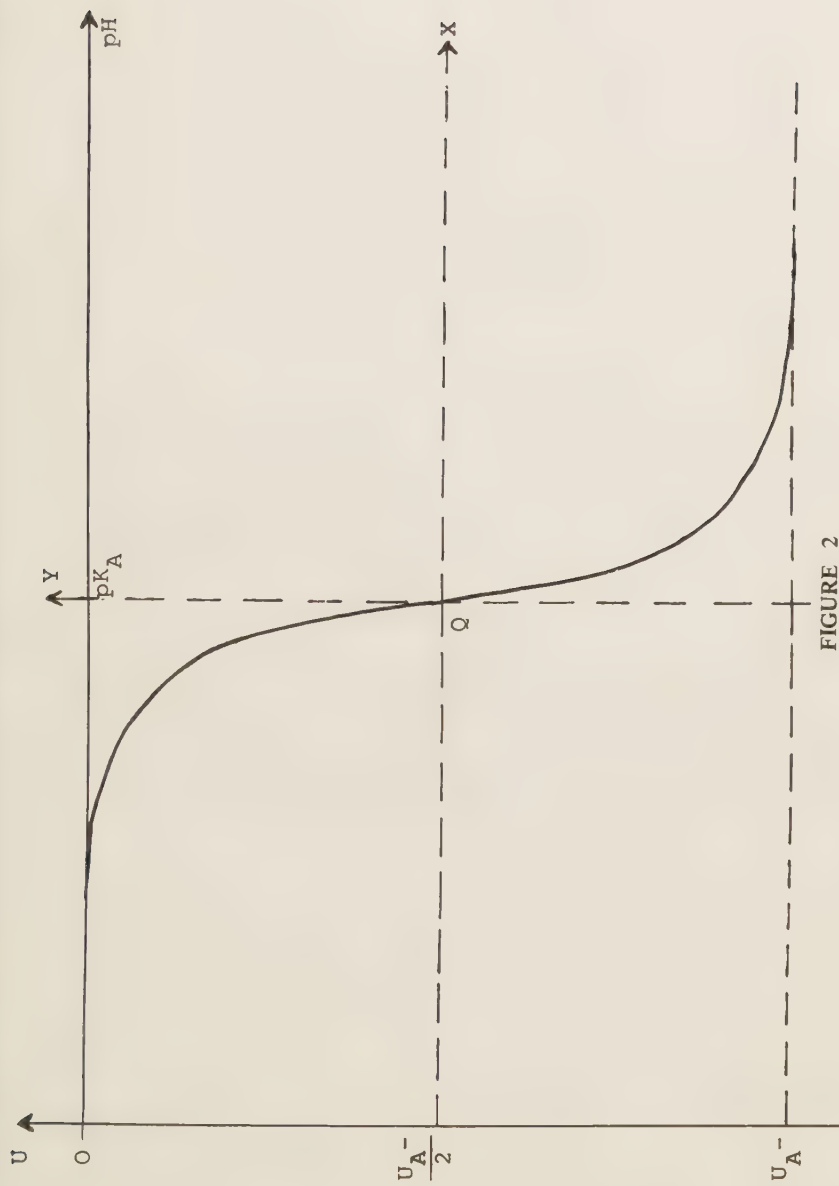


FIGURE 2

Représentation graphique de la fonction $U = f(\text{pH})$

ou encore :
$$Y = \frac{u_{A^-}}{2} \cdot \left[\frac{1 - e^{-2,3X}}{1 + e^{-2,3X}} \right]$$

D'après la définition de la tangente hyperbolique, qui s'écrit :

$$\text{th. } x = \frac{e^x - e^{-x}}{e^x + e^{-x}} = \left[\frac{1 - e^{-2x}}{1 + e^{-2x}} \right]$$

l'expression de U devient :

$$U = \frac{u_{A^-}}{2} \cdot \left[1 + \text{th. } \frac{2,3}{2} (pH - pK_A) \right]$$

La représentation graphique de cette fonction est une sigmoïde, admettant le point Q comme centre de symétrie et présentant les asymptotes d'ordonnées : $U = 0$ et $U = u_{A^-}$.

Expérimentalement, après avoir déterminé les variations de la mobilité de zone en fonction du pH, la valeur de pK_A sera déduite graphiquement. Elle sera donnée par la valeur de pH correspondant à une mobilité égale à $\frac{1}{2} u_{A^-}$, moyenne des mobilités des espèces HA et A^- .

CHAPITRE III

BASES DE L'EXPERIMENTATION

La détermination expérimentale des constantes de stabilité des complexes en solution, à l'aide de l'électrophorèse sur couches minces, dépend évidemment de la mesure exacte et reproductible des mobilités électrophorétiques. Il est donc indispensable de s'appuyer sur un protocole expérimental soigneusement étudié et parfaitement défini.

Les très nombreuses références bibliographiques, que nous avons été amenés à consulter, nous ont permis de mettre en évidence les divers paramètres susceptibles d'influencer la migration électrophorétique sur support. Les «paramètres libres» concernent essentiellement l'électrolyte tampon, dont la concentration et la force ionique doivent être rigoureusement fixées, de même que la température d'expérience.

Parmi les «paramètres de zone», le pouvoir adsorbant du support utilisé et l'influence du «flot du tampon», lié aux phénomènes d'électro-osmose et d'évaporation, doivent être déterminés systématiquement.

Enfin, il est capital de connaître aussi exactement que possible, la constance et l'homogénéité du champ électrique, dans les conditions expérimentales choisies.

Ces différents points constituent les bases de notre expérimentation et seront envisagés successivement.

I — Fixation des paramètres libres.

1 — Nature de l'électrolyte :

Dans toute la gamme de pH étudiée, nous avons utilisé le même électrolyte de fond, de façon à conserver à la solution :

- une conductance relativement faible, susceptible de n'engendrer que des intensités modérées et d'atténuer ainsi les phénomènes d'évaporation dus à l'effet Joule, de même que les phénomènes d'électrolyse.
- un pouvoir tampon efficace, tant en milieu acide que basique. Pendant toute la durée d'une électrophorèse, il est primordial en effet que chaque constituant étudié conserve une charge constante et en évitant les variations d'ionisation, la mobilité mesurée reste invariable au cours de l'expérience.

Nous avons cherché de plus un système tampon, présentant vis à vis des substances étudiées le minimum de pouvoir complexant : c'est la cas du mélange acétate-borate, qui constitue le tampon fondamental pour la plupart de nos expérimentations. D'autres couples acide-base faibles ont été également employés, lorsqu'ils présentaient des risques minimes d'interaction avec les ions migrants (acide phosphorique). Par contre, pour l'étude de certains types de complexes, ce mélange tampon fondamental est additionné de quantités constantes de l'agent complexant considéré, qui est aussi très souvent un acide faible (acide citrique).

2 — Force ionique :

En raison de la dissociation des acides faibles constituant le système tampon, qui augmente en fonction du pH, la force ionique de la solution subit des variations importantes dans la gamme de pH prospectée. Ces variations ont une influence manifeste sur les mobilités électrophorétiques, ainsi que nous l'avons signalé dans un chapitre précédent. Les variations de la force ionique entraînent en outre des modifications du degré de dissociation apparent des complexes analysés. Aussi, pour chaque valeur de pH, la force ionique de la solution tampon a-t-elle été maintenue constante, par addition de quantités

convenables de KNO_3 , électrolyte fort dénué de pouvoir complexant vis à vis des différents ions étudiés.

3 — Température :

L'augmentation de température due à l'effet Joule est responsable des phénomènes suivants :

- modification de la viscosité du milieu support (ensemble substrat solide-solution tampon), agissant sur la valeur des mobilités,
- accroissement de l'évaporation, entraînant celui du «flot du tampon» à partir des réservoirs à électrodes ; très variable selon les différents points du substrat, sa détermination reste peu précise,
- modification de la résistance du milieu support, entraînant celle de l'intensité ou du voltage, suivant le paramètre que l'on maintient constant.

Pour obtenir des mesures de mobilités aisées et précises, nous avons donc été amenés à diminuer au maximum le phénomène d'évaporation. C'est encore le système de refroidissement, utilisant un bloc métallique parcouru par un courant d'eau froide, qui s'est montré le plus pratique ; il est d'ailleurs utilisé par la plupart des expérimentateurs (2, 3, 15). Nous avons vérifié l'efficacité du refroidissement, en utilisant la méthode décrite par Badzio et Pomowski (1), qui consiste à tracer les courbes $I = f(V)$ pour une solution tampon donnée.

On peut distinguer sur cette courbe trois portions :

- une portion AB linéaire, correspondant à une intensité et à un voltage, pour lesquels le milieu support reste à la même température que le dispositif de refroidissement.
- une portion BC incurvée, traduisant une augmentation accrue de l'intensité et pour laquelle la température du milieu support reste supérieure à celle du dispositif de refroidissement.
- au-delà du point C, la température du support augmente encore plus rapidement.

On peut donc admettre que le point B représente la capacité maximale

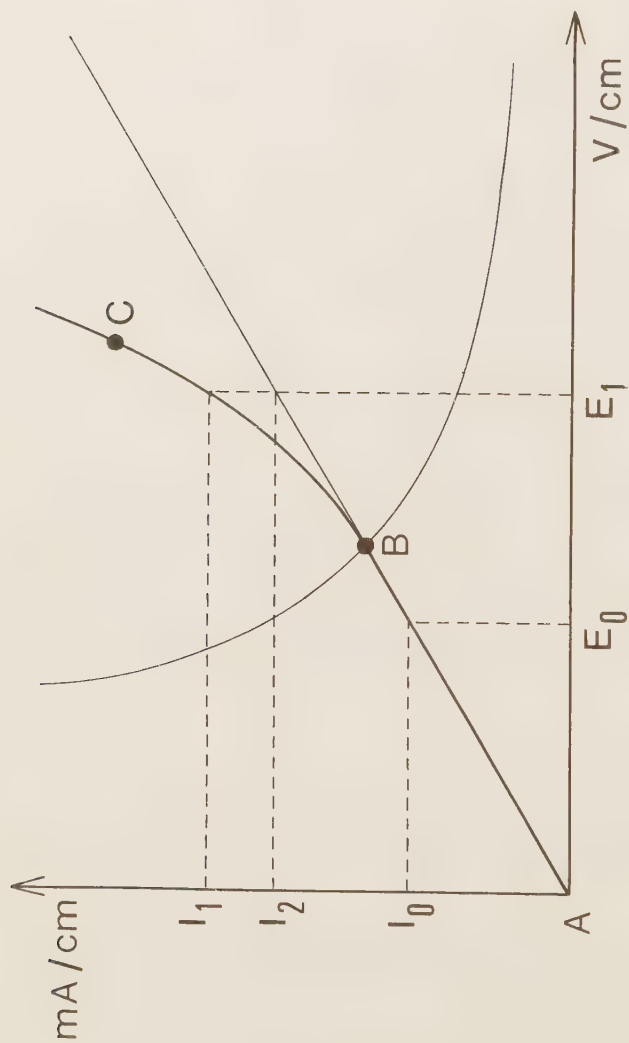


FIGURE 3

Courbe schématique représentant les variations de l'intensité du courant en fonction du voltage appliqué, au cours de l'Electrophorèse sur papier (d'après Badzio et Pompowski, J. Chromatog., 1969, 39, 344).

de dissipation de chaleur du système considéré, lorsque la température du milieu support est maintenue constante.

Pour des solutions tampon de nature ou de concentration différentes, on obtient des courbes d'allure identique et les points B correspondants sont situés sur une hyperbole commune ; cette hyperbole, dite « d'égale puissance », caractérise l'aptitude de l'ensemble électrophorétique à dissiper la chaleur.

Il est à noter que la position du point C ne peut être fixée avec précision.

L'observation de ces courbes permet en outre de déterminer la valeur du champ électrique à appliquer dans les conditions expérimentales choisies.

Nos expériences personnelles ont été conduites sur trois sortes de solutions tampon, de composition variable, mais toutes au même pH :

Tampon n° I	acide borique	0, 1 M
	acide acétique	0, 1 M
	pH = 4	
	force ionique $\mu = 0, 21$	
	conductivité mesurée $\chi = 1, 75 \cdot 10^{-2} \cdot \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	
Tampon n° II	acide borique	0, 02 M
	acide acétique	0, 02 M
	acide phosphorique	0, 02 M
	pH = 4	
	force ionique $\mu = 0, 117$	
	conductivité mesurée $\chi = 1, 04 \cdot 10^{-2} \cdot \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	
Tampon n° III	acide borique	0, 25 M
	acide citrique	0, 083 M
	pH = 4	
	force ionique $\mu = 0, 70$	
	conductivité mesurée $\chi = 4, 52 \cdot 10^{-2} \cdot \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	

Nous avons fait varier le champ électrique appliqué de 0 à 25 volts/cm.

et la mesure de l'intensité correspondante, exprimée en milliampères/cm., nous a permis de tracer les courbes $I = f(V)$ (figure 4).

Sur chacune d'elles, il est possible de déterminer une valeur optimale du champ électrique, identique pour les trois sortes de tampon et correspondant à une capacité de refroidissement suffisante. Nous avons choisi un champ de 10 volts/cm., qui nous permet de rester dans les portions linéaires de chacune des courbes.

Malgré ces précautions, nous avons malheureusement constaté, d'une expérience à l'autre, des variations de mobilité encore appréciables et ceci nous a conduit à exprimer les résultats en mobilités relatives, ce qui suppose une distribution homogène de la température dans tout le milieu support.

II - Détermination des paramètres de zone.

1 - Flot du tampon ou flux hydrodynamique :

Nous avons vu dans la première partie que l'on désignait sous ce terme la résultante des mouvements liquides, dus à la fois au phénomène d'électro-osmose et au phénomène d'évaporation du solvant par effet Joule. Utilisant un système réfrigérant, dont nous nous sommes assurés précédemment de l'efficacité, la mesure du flot électro-osmotique nous a paru suffisante.

Cette détermination est fondée essentiellement sur la mesure du déplacement de molécules non ionisées, telles que le glucose ou l'urée (23).

Nous n'avons pas, en ce qui nous concerne, retenu le glucose comme substance de référence, en raison de l'emploi des tampons à base de borate de sodium ; en effet, nous avons constaté expérimentalement une interaction, prévisible d'ailleurs, entre le glucose et l'ion borate, conduisant à la formation de complexes anioniques (25, 31) et privant ainsi la molécule de sucre de sa neutralité électrique. Nous avons donc choisi l'urée comme substance de référence non chargée. Cependant, l'action exercée par le flux hydrodynamique sur le déplacement électrophorétique peut varier d'une particule à l'autre : elle dépend de la nature et de la charge de la particule considérée, vis-à-vis de laquelle le substrat possède un pouvoir de rétention propre.

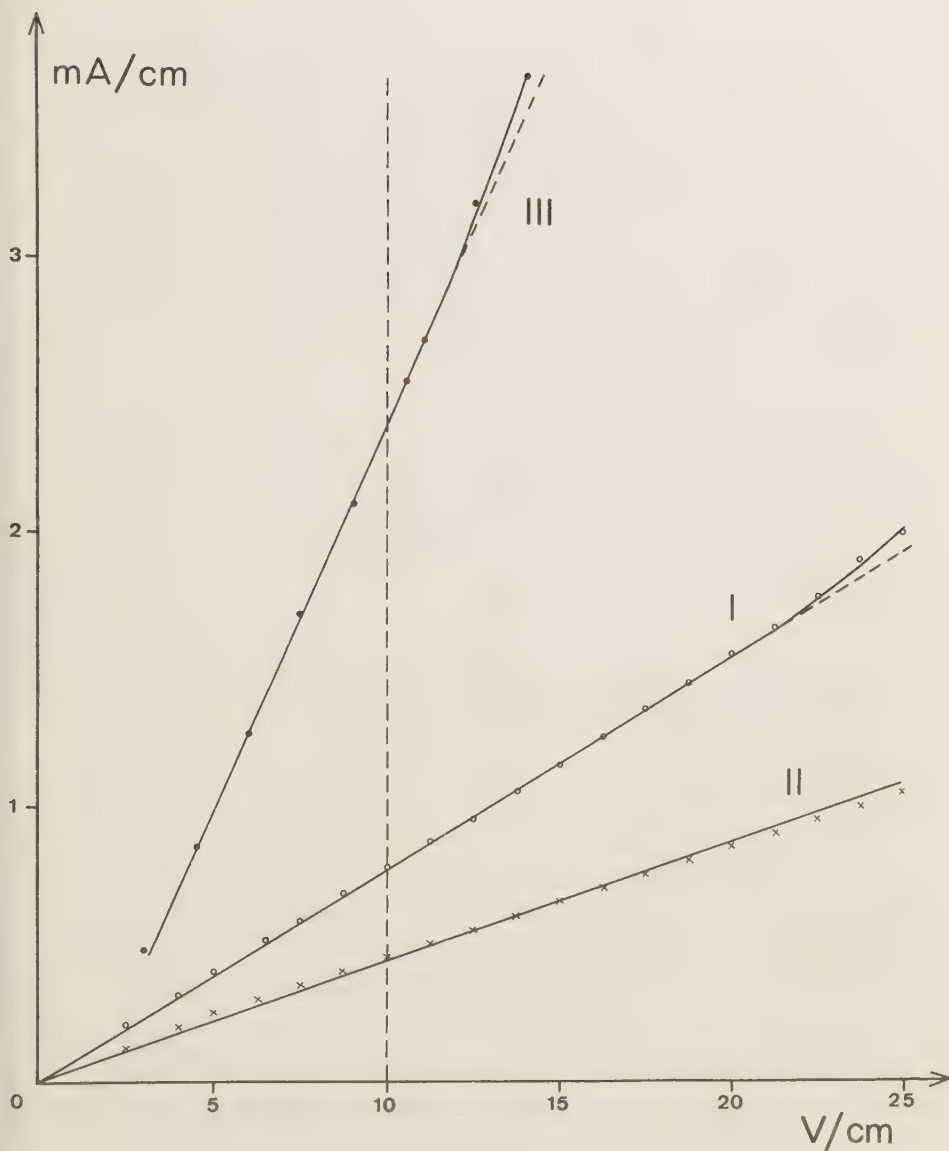


FIGURE 4

Courbes expérimentales représentant les variations de l'intensité du courant en fonction du voltage appliqué, au cours de l'Electrophorèse sur couches minces de Cellulose et en utilisant un système de refroidissement classique par circulation d'eau. Les courbes I, II et III ont été obtenues respectivement avec les tampons I, II et III décrits dans le texte.

Nous avons donc été amenés à définir, pour chaque particule, un coefficient de rétention, évalué par chromatographie sur couches minces et dans les mêmes conditions que l'électrophorèse, c'est-à-dire avec le même substrat (cellulose), le même tampon et au même pH. Ce coefficient, qui permet de corriger l'influence du support sur le flot électro-osmotique, peut être exprimé par le rapport du R_f du complexe étudié au R_f' de la molécule de référence non chargée. Si d représente le déplacement électrophorétique mesuré du complexe étudié et d' celui de la molécule non ionisée, le déplacement corrigé du complexe est donné par l'une des expressions suivantes :

$$d_c = d + d' \cdot \frac{R_f}{R_f'}$$

ou

$$d_c = d - d' \cdot \frac{R_f}{R_f'}$$

selon que le flot s'oppose à sa migration ou la favorise.

2 - Effet du support :

Le substrat constituant le milieu support est susceptible d'engendrer divers phénomènes, capables de modifier le déplacement électrophorétique et déjà bien connus en chromatographie. Il s'agit du tamisage moléculaire, de l'adsorption et de l'échange d'ions. Nos expériences étant effectuées uniquement sur cellulose et en solution aqueuse, nous avons cru pouvoir négliger d'emblée les phénomènes d'échanges d'ions.

En ce qui concerne la filtration moléculaire, ce phénomène n'atteint une ampleur appréciable, que pour des molécules de dimensions importantes (protéines) et dans des milieux gélifiés de concentration suffisante.

Dans nos expériences sur couches minces de cellulose et avec des molécules de petite taille, telles que les polyacides carboxyliques, les acides aminés ou les complexes citriques, ce phénomène semble pouvoir être négligé également.

Nous avons été amenés précédemment à tenir compte des phénomènes d'adsorption vis-à-vis des molécules de référence non ionisées, servant à évaluer le flot électro-osmotique. Pour les ions minéraux et les ions organiques de petite taille, auxquels nous nous sommes adressés au cours de notre étude, les phénomènes d'adsorption sur cellulose ne sont jamais très importants.

Les chromatographies effectuées pour la correction du flot électro-osmotique nous ont effectivement montré que, dans le cas des ions et des complexes étudiés, cette adsorption, restait toujours très faible dans toute la gamme de pH explorée. Cette constatation expérimentale présentait une importance toute particulière en vue de l'étude des mobilités en fonction du pH que nous avons entreprise. Elle s'explique par la force ionique toujours relativement élevée des solutions tampons utilisées, (10, 11) et également par la présence fréquente d'acide acétique, dont l'influence sur les phénomènes d'adsorption sur cellulose a déjà été signalée pour de nombreuses substances.

III - Champ électrique.

Les expériences décrites précédemment et destinées à évaluer les phénomènes d'évaporation nous ont permis de choisir la valeur optimale du champ électrique continu à appliquer (10 volts/cm) avec l'appareillage classique utilisé et décrit plus loin. Une détermination relativement précise des mobilités absolues implique avant tout, que le gradient de potentiel reste constant pendant toute la durée de l'expérience. L'évaluation des mobilités relatives présentes à cet égard un avantage certain, en diminuant considérablement l'influence des variations du champ électrique en fonction du temps ; seule l'homogénéité du champ sur l'ensemble de la couche mince demeure primordiale.

Nous avons donc été amenés à contrôler, selon le procédé proposé par Heftmann (8), la constance et l'homogénéité du gradient de potentiel, obtenu avec l'appareillage utilisé et qui est constitué par :

- une cuve électrophorétique pour couches minces Desaga (Heidelberg), avec bloc métallique de refroidissement par eau courante ,
- un système redresseur-régulateur de courant, permettant de travailler de zéro à 500 volts, soit à voltage constant , soit à intensité constante.

Il est bon de remarquer que le champ électrique choisi, de 10 volts/cm, correspond effectivement au champ réel existant sur la couche mince imprégnée de tampon. Des mesures directes de différence de potentiel entre les extrémités du substrat, au début de chaque expérience, nous ont permis de régler le voltage appliqué au départ du générateur et d'éliminer ainsi les chutes de potentiel dues à l'éloignement des électrodes et aux systèmes de jonction en papier filtre.

1 - Contrôle de l'homogénéité du champ :

En des points équidistants, situés sur des lignes obliques parallèles à une diagonale de la plaque, ont été déposées des prises d'essai identiques de la substance ionisée étudiée. Au bout d'un temps d'électrophorèse de une heure, on relie le centre géométrique de chacun des spots, obtenus après migration des dépôts d'une même diagonale. Si le champ est resté homogène pendant la durée de l'expérience, tous les spots homologues doivent être situés sur de nouvelles diagonales parallèles aux lignes de départ. C'est ce que nous avons constaté de façon régulière, pour un champ réel de 10 volts/cm, sur toute la surface du support, à l'exception des zones de 2 cm de largeur environ situées d'une part sur les deux bords latéraux et d'autre part aux deux extrémités de la plaque, près des jonctions en papier filtre.

Par la suite, nous n'avons donc utilisé, pour nos études de migration, que la surface de la couche mince ainsi définie.

2 - Contrôle de la constance du champ :

La même technique a été utilisée en opérant avec une intensité constante de 20 milliampères. Nous avons constaté, après migration, un parallélisme beaucoup moins marqué des différentes diagonales qu'en opérant à voltage constant. En outre, un contrôle du voltage aux bornes du générateur nous a permis d'enregistrer des variations notables en cours d'expérimentation. Ces deux tests montrent que le champ électrique subit des variations en fonction

du temps, mais reste homogène sur la surface de la couche mince précédemment définie. Comme nous l'avons déjà précisé, cette homogénéité du champ est suffisante pour l'expression des mobilités en valeurs relatives d'après la méthode suivante.

IV - Expression des mobilités.

Au début de notre expérimentation et à partir de nos premiers résultats, nous avons tenté d'exprimer en valeur absolue les mobilités apparentes, obtenues sur couches minces de cellulose. Malgré un protocole opératoire rigoureux, nous avons rapidement constaté, pour un même pH, des fluctuations notables de ces mobilités. Les différences observées sont attribuables vraisemblablement aux variations du champ électrique en cours d'électrophorèse. Néanmoins, le champ électrique restant homogène sur la plus grande partie de la couche mince, il est possible de déterminer simultanément, pour chaque expérience, la mobilité d'un ion de référence convenablement choisi.

L'influence des variations du champ électrique sur la migration de l'ion de référence étant sensiblement la même que sur celle des ions étudiés, il est donc parfaitement légitime de rapporter les mobilités de ces derniers à celle de l'ion de référence. Pour un même pH, les fluctuations des mobilités relatives sont ainsi considérablement atténuées et restent du même ordre de grandeur que les erreurs expérimentales. D'autre part, l'expérimentation s'effectuant sur une gamme de pH très étendue (2 à 10), il est nécessaire de choisir un ion de référence particulièrement stable et facilement repérable. Comme d'autres expérimentateurs, notre choix s'est porté sur l'ion picrate, correspondant à un acide organique naturellement coloré, relativement fort, en solution aqueuse ($pK_A = 0,30$) et dont l'ionisation est pratiquement complète dans la zone de pH étudiée. Cet ion présente en outre l'avantage de n'engendrer aucune réaction de complexation avec les constituants du tampon. Exprimées par rapport à l'ion picrate de référence, ces mobilités relatives sont aussi des mobilités apparentes, dont la validité est limitée aux conditions expérimentales choisies, telles que la nature du support (cellulose) et de l'électrolyte tampon, la force ionique et le pH de ce dernier.

V - Forme et dimensions des spots.

Un des problèmes majeurs de la chromatographie, comme de l'électrophorèse sur support, est la délimitation précise en fin de migration des zones de répartition des substances étudiées. Pour un dépôt initial pratiquement ponctuel, la diffusion par capillarité conduit en fait à la formation d'une tache circulaire au point de départ dont la déformation s'accroît au cours de la migration.

La mesure des R_f , comme des mobilités, nécessitant l'appréciation relativement rigoureuse des centres géométriques des spots obtenus, ce problème présente donc une importance capitale. La forme des spots et leur surface dépendent essentiellement du support utilisé et de la structure proprement dite des substances étudiées.

Il peut s'agir tout d'abord d'un simple phénomène de diffusion, observé surtout pour des molécules de faibles dimensions et pour un degré d'humidité élevé du milieu support. L'intensité de la diffusion serait donc maximale, d'une part au moment du dépôt des échantillons sur un milieu préalablement humidifié et d'autre part en fin d'expérience, dès l'instant où l'on supprime le champ électrique et jusqu'au séchage complet du support. On peut en effet considérer les phénomènes de diffusion comme négligeables en cours de migration.

Plus constant est le phénomène d'adsorption et son influence sur la forme des spots peut être extrêmement marquée. Dans ce cas, au lieu d'obtenir des spots légèrement elliptiques, on constate la formation de traînées plus ou moins importantes.

Le même phénomène peut s'observer lorsque coexistent dans le même échantillon, en cours de migration, deux espèces chimiques différemment chargées et en équilibre, dont les vitesses de transformation mutuelles sont relativement lentes par rapport à la durée d'électrophorèse. On n'aboutit jamais, dans ce cas, à une véritable séparation, mais à une répartition des deux espèces dans une zone relativement étalée.

D'autres facteurs sont susceptibles d'intervenir encore dans la déformation des spots et en particulier les variations de température, l'hétérogénéité

du flux hydrodynamique ou du champ électrique (28), de même qu'une différence marquée entre la force ionique de la solution tampon utilisée et celle de l'échantillon à analyser. Ce dernier facteur a été particulièrement étudié par Strain, Sato et Miller (17, 21, 26), qui ont enregistré une augmentation linéaire de la dimension des spots, en fonction de la racine carrée de la concentration de l'échantillon à analyser, lorsque cette dernière est supérieure à celle de la solution tampon ; cependant, Miller (16) a également souligné que l'étalement des spots dépendait avant tout de la nature de la substance migrante étudiée. C'est le cas de molécules de poids moléculaire élevé, telles que l'hémoglobine (13), caractérisées par une répartition hétérogène des charges, alors que, pour l'albumine ou le dextrane, les spots accusent une déformation beaucoup moins marquée.

VI - Protocole expérimental général.

Toutes les expériences ont été réalisées sur couches minces de cellulose microcristalline sans plâtre (Macherey - Nagel and Co), de 0, 25 mm d'épaisseur et étalées sur plaque de verre. On utilise un appareillage d'électrophorèse classique, alimenté par une source de courant continu stabilisé, muni d'un bloc métallique réfrigérant à circulation d'eau.

L'horizontabilité parfaite du bloc, sur lequel est déposé la plaque de verre, est contrôlée avant chaque expérience.

Les différentes solutions tampon sont ajustées au pH désiré à l'aide d'une solution aqueuse de NaOH et la force ionique est fixée à la valeur désirée, par addition de quantités variables de KNO_3 . L'égalité des niveaux de la solution électrolytique, dans les compartiments anodique et cathodique, est également vérifiée avant chaque expérience. Les échantillons des ions étudiés sont constitués par des solutions de force ionique aussi voisine que possible de celle de la solution tampon employée. L'imprégnation homogène de la couche mince est obtenue par une pulvérisation rapide et régulière de la solution tampon. Le contact entre la couche mince ainsi humidifiée et l'électrolyte, contenu dans les bacs à électrodes, est assurée par des feuilles de papier-filtre épais imprégnées du tampon.

Ce système présente également l'avantage d'empêcher la diffusion vers la couche mince des produits d'électrolyse, susceptibles de modifier de façon plus ou moins importante les caractéristiques du milieu support.

Pour toutes nos expériences, la durée d'électrophorèse a été fixée à une heure, le champ électrique à 10 volts/cm, la différence de potentiel étant mesurée directement aux extrémités de la couche mince.

Après séchage rapide sous une lampe I.R., la révélation des divers ions est obtenue par pulvérisation de réactifs spécifiques, sauf pour l'ion picrate dont la coloration propre est suffisante. Utilisée comme substance indicatrice du flot tampon, l'urée est révélée par action du paradiméthyl-aminobenzaldéhyde, suivie d'une exposition aux vapeurs chlorhydriques.

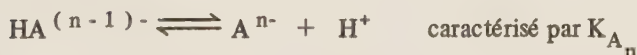
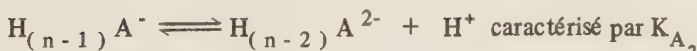
Pour chaque ion étudié et pour chaque valeur de pH, dix expériences sont réalisées ; une mobilité relative moyenne est calculée, après élimination des valeurs extrêmes, correspondant à une dispersion supérieure à plus ou moins dix pour cent, par rapport à cette moyenne. Il s'agit là du protocole expérimental général, utilisé systématiquement pour toutes nos expériences. Nous donnerons par la suite quelques précisions complémentaires, concernant certains points particuliers.

CHAPITRE IV

ACIDES FAIBLES POLY-CARBOXYLIQUES.

I - Application de la théorie générale.

Soit l'agent complexant A^{n-} vis-à-vis du proton, c'est-à-dire la polybase conjuguée du polyacide $H_n A$, dont les dissociations successives sont :



Si toutes ces formes existent simultanément, la mobilité de zone est donnée par l'expression :

$$U = \frac{u_0 |H_n A| + u_1 |H_{(n-1)} A^-| + \dots + u_n |A^{n-}|}{|H_n A| + |H_{(n-1)} A^-| + \dots + |A^{n-}|}$$

Deux cas sont à envisager :

- Si, dans un certain intervalle de pH, deux formes prédominent, la mobilité de zone électrophorétique dépendra essentiellement des mobilités respectives des deux complexes envisagés.

— Si, par contre, dans ce même intervalle de pH, plusieurs formes interviennent, la mobilité de zone s'exprimera alors en fonction des mobilités de chacun des complexes présents dans le milieu.

Pour faciliter la compréhension de cette étude, nous envisagerons le cas le plus simple d'un diacide faible H_2A , caractérisé par les deux équilibres :



1 - Cas où deux formes prédominent.

a) Ces deux formes sont H_2A et HA^- (1er équilibre).

Le problème se ramène à l'exemple précédent, relatif à un mono-acide faible et, si l'on appelle u_1 la mobilité de HA^- , la mobilité de zone a pour expression :

$$U = \frac{u_1}{2} \cdot \left[1 + \text{th.} \frac{2,3}{2} (pH - pK_{A_1}) \right] \quad (1)$$

b) Ces deux formes sont HA^- et A^{2-} (2ème équilibre).

Si l'on appelle u_2 la mobilité de A^{2-} , la mobilité de zone s'écrit :

$$U = \frac{u_1 |HA^-| + u_2 |A^{2-}|}{|HA^-| + |A^{2-}|}$$

Soit, en fonction de $|H^+|$ et de K_{A_2} :

$$U = \frac{u_1 + u_2 \cdot (K_{A_2} / |H^+|)}{1 + K_{A_2} / |H^+|}$$

Dans le cas particulier où $pH = pK_{A_2}$, on a : $U = \frac{u_1 + u_2}{2}$

et la fonction $U = f(pH)$ est donnée par l'expression :

$$U = \frac{u_1 + u_2}{2} + \left[\frac{u_2 - u_1}{2} \cdot \text{th.} \frac{2,3}{2} (pH - pK_{A_2}) \right] \quad (2)$$

La courbe représentative des variations de la mobilité de zone de l'acide H_2A en fonction du pH est donc formée de deux sigmoïdes, l'une correspondant à un domaine de pH situé autour de pK_{A_1} l'autre correspondant à un domaine de pH situé autour de pK_{A_2} . Les deux sigmoïdes admettent une asymptote commune, d'ordonnée $U = u_1^2$

En effet, pour $pH = 1/2 pK_{A_1} + 1/2 pK_{A_2}$, la forme ampholyte HA^- prédomine et la mobilité de zone correspondante est égale à u_1 .

Cependant, dans le domaine de pH entourant la valeur $\frac{pK_{A_1} + pK_{A_2}}{2}$

il convient de tenir compte de la présence des trois formes, H_2A , HA^- et A^{2-} ; la mobilité U est donnée alors par la relation générale :

$$U = \frac{u_1 |HA^-| + u_2 |A^{2-}|}{|H_2A| + |HA^-| + |A^{2-}|}$$

Soit, d'après les constantes de dissociation :

$$U = \frac{u_1 \cdot K_{A_1} \cdot |H^+| + u_2 \cdot K_{A_1} \cdot K_{A_2}}{|H^+|^2 + K_{A_1} \cdot |H^+| + K_{A_1} \cdot K_{A_2}}$$

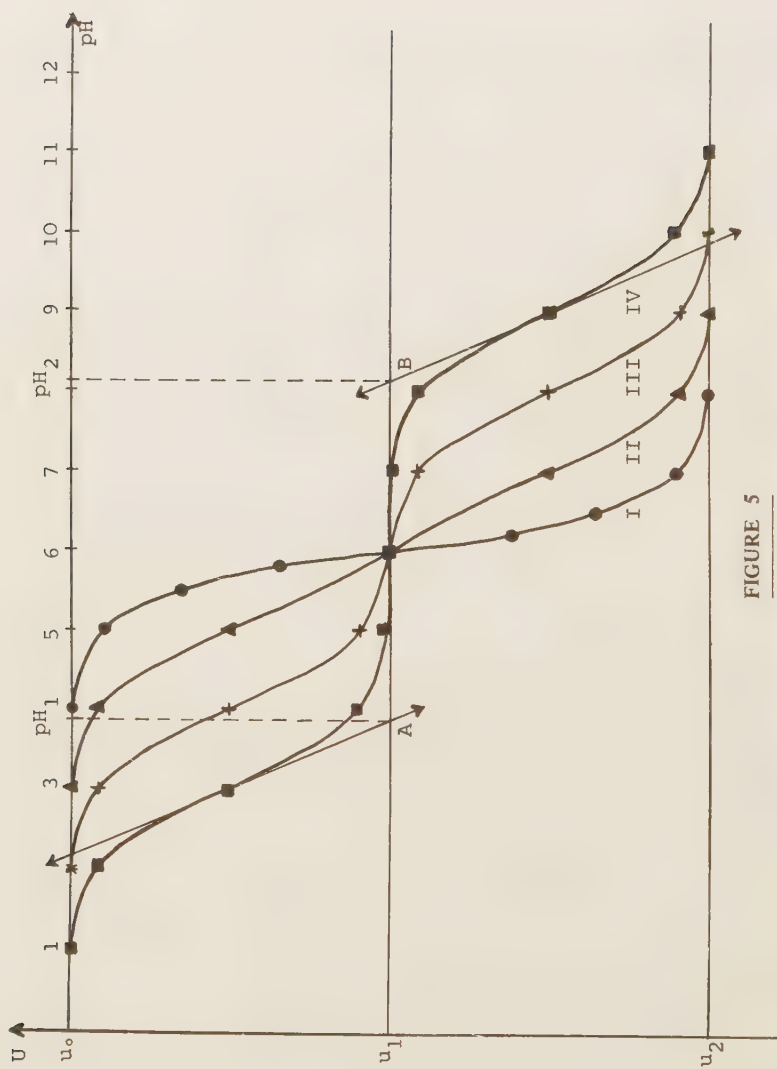


FIGURE 5

Conditions d'individualisation de deux sigmoïdes successives.

Courbe I : ●●●● pour $\Delta pK = 0$ Courbe III : ++++ pour $\Delta pK = 4$
 Courbe II : ▲▲▲▲ pour $\Delta pK = 2$ Courbe IV : ■■■■ pour $\Delta pK = 6$

Pour la valeur de $\text{pH} = \frac{1}{2} (\text{pK}_{A_1} + \text{pK}_{A_2})$, on a :

$$U = \frac{u_1 + u_2 \cdot \sqrt{K_{A_2} / K_{A_1}}}{1 + 2 \cdot \sqrt{K_{A_2} / K_{A_1}}}$$

Pour que soit vérifiée la proposition précédente, à savoir $U = u_1$ pour $\text{pH} = \frac{1}{2} (\text{pK}_{A_1} + \text{pK}_{A_2})$, il faut que le rapport K_{A_2} / K_{A_1} soit suffisamment petit, c'est-à-dire que pK_{A_1} soit nettement inférieur à pK_{A_2} .

Toutefois, si l'on admet avec Biernat (5), que la mobilité de chaque ion complexe est essentiellement proportionnelle à sa charge, l'hypothèse $u_2 = 2u_1$ semble la plus logique.

Pour $\text{pH} = \frac{1}{2} (\text{pK}_{A_1} + \text{pK}_{A_2})$, on aura alors :

$$U = \frac{u_1 \cdot (1 + 2 \sqrt{K_{A_2} / K_{A_1}})}{(1 + 2 \sqrt{K_{A_2} / K_{A_1}})} = u_1$$

quelle que soit la valeur de K_{A_1} et de K_{A_2}

c) Conditions d'individualisation de deux sigmoïdes successives.

Il semblait logique de prévoir que le palier intermédiaire, correspondant à la prédominance de la forme ampholyte HA^- , serait d'autant plus net que la différence $\Delta\text{pK} = \text{pK}_{A_2} - \text{pK}_{A_1}$ serait elle-même plus importante. Nous avons tenté de calculer la valeur de ΔpK , en-dessous de laquelle le palier ne doit plus être observable expérimentalement. Cela revient à déterminer la valeur du segment de droite AB, limité par les points d'intersection de la droite $U = u_1$, avec les tangentes aux points d'inflexion, d'abscisses pK_{A_1} et pK_{A_2} (fig. 5).

Les équations de ces tangentes sont de la forme :

$$u = u' (\text{pK}_{A_1}) \cdot \text{pH} + b_1 \quad (3)$$

et
$$u = u' (\text{pK}_{A_2}) \cdot \text{pH} + b_2 \quad (4)$$

où $u' (pK_{A_1})$ est la dérivée au point d'abscisse pK_{A_1} de la fonction (1) et $u' (pK_{A_2})$ la dérivée au point d'abscisse pK_{A_2} de la fonction (2).

Le calcul des dérivées première et seconde de U conduit aux expressions :

$$u' (pK_{A_1}) = \frac{2,3}{4} \cdot u_1$$

et
$$u' (pK_{A_2}) = \frac{2,3}{4} \cdot (u_2 - u_1)$$

De plus, on détermine facilement les ordonnées à l'origine b_1 et b_2 de ces tangentes, en se plaçant successivement aux points d'inflexion de chaque sigmoïde ; on obtient ainsi :

$$b_1 = u_1 \left(\frac{1}{2} - \frac{2,3}{4} \cdot pK_{A_1} \right)$$

et
$$b_2 = u_1 \left(\frac{1}{2} + \frac{2,3}{4} \cdot pK_{A_2} \right) + u_2 \left(\frac{1}{2} - \frac{2,3}{4} \cdot pK_{A_2} \right)$$

En portant ces valeurs dans les relations (3) et (4), les équations des tangentes s'écrivent :

$$u = \left(\frac{2,3}{4} \cdot u_1 \cdot pH \right) + u_1 \left(\frac{1}{2} - \frac{2,3}{4} \cdot pK_{A_1} \right) \quad (5)$$

et
$$u = \frac{2,3}{4} \cdot (u_2 - u_1) \cdot pH + u_1 \left(\frac{1}{2} + \frac{2,3}{4} \cdot pK_{A_2} \right) + u_2 \left(\frac{1}{2} - \frac{2,3}{4} \cdot pK_{A_2} \right) \quad (6)$$

Les coordonnées des points A et B doivent satisfaire respectivement à l'équation (5) et à l'équation (6). On tire facilement leurs abscisses pH_1 et pH_2 .

$$pH_1 = pK_{A_1} + \frac{2}{2,3}$$

et
$$pH_2 = pK_{A_2} - \frac{2}{2,3}$$

Ce qui permet de calculer la valeur du segment AB :

$$\overline{AB} = \text{pH}_2 - \text{pH}_1 = \text{pK}_{A_2} - \text{pK}_{A_1} - \frac{4}{2,3}$$

et de constater que l'existence du palier implique que :

$$\boxed{\Delta \text{pK} > \frac{4}{2,3}} \quad (7)$$

Cette relation est objectivée par les courbes théoriques obtenues en faisant varier la différence des pK de deux équilibres successifs. Il semble évident toutefois qu'un palier ne sera parfaitement observable, que si la différence ΔpK est au moins supérieure à 3 unités, comme on a pu d'ailleurs le vérifier sur des données expérimentales.

Lorsque la différence des pK, correspondant à deux équilibres successifs d'un même système, est inférieure à environ 2 unités, c'est-à-dire pour des pK très voisins, aucun palier ne peut plus être observé.

2 - Cas où toutes les formes coexistent.

La mobilité de zone s'exprime alors par la formule générale, établie précédemment :

$$U = \frac{u_1 | \text{HA}^- | + u_2 | \text{A}^{2-} |}{| \text{H}_2\text{A} | + | \text{HA}^- | + | \text{A}^{2-} |} = \frac{u_1 \cdot K_{A_1} | \text{H}^+ | + u_2 \cdot K_{A_1} \cdot K_{A_2}}{| \text{H}^+ |^2 + K_{A_1} | \text{H}^+ | + K_{A_1} \cdot K_{A_2}}$$

Dans ce cas, la courbe représentative de U en fonction du pH offre l'aspect d'une sigmoïde unique, délimitée par les deux paliers, d'ordonnées :

$$U = u_0 = 0 \quad \text{et} \quad U = u_2$$

Ainsi que nous l'avons précisé antérieurement, d'après l'hypothèse $u_1 = \frac{1}{2} u_2$ (5), U prend la valeur de u_1 pour $\text{pH} = \frac{1}{2} (\text{pK}_{A_1} + \text{pK}_{A_2})$.

La courbe présente alors une symétrie par rapport au point de coordonnées :

$$U = u_1 = \frac{1}{2} u_2 \quad \text{et} \quad \text{pH} = \frac{1}{2} (\text{pK}_{A_1} + \text{pK}_{A_2})$$

qui permet la détermination expérimentale d'une constante globale du système.

En ce qui concerne les acides, dont les différentes formes ne diffèrent que par le nombre de protons fixés au radical anionique, cette hypothèse semble légitime. Cependant, certains phénomènes, tels que :

- la variation du degré de solvation des différents ions (12) ,
- leur interaction avec les ions du tampon, de signe opposé (14) ,
- leur interaction avec le support, qui dépend de leur charge et par conséquent du pH ,

sont susceptibles de modifier cette proportionnalité et de rendre la mesure d'un pK_A moyen d'autant plus incertaine, que la molécule est riche en fonctions acides de pK_A voisins. C'est le cas, par exemple, pour l'acide citrique, que nous avons étudié expérimentalement.

II - Expérimentation.

1 - Protocole expérimental.

Au protocole expérimental général, exposé dans le chapitre précédent, nous n'ajouterons que les quelques précisions techniques suivantes.

La solution tampon, contenant 0,1 mole/l. d'acide borique et 0,1 mole/l. d'acide acétique, est ajustée au pH désiré à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium et, pour quelques pH inférieurs à 2, 8, avec une solution aqueuse d'acide nitrique. La force ionique est fixée à 0, 21 par addition de quantités variables de KNO_3 , en fonction du pH étudié.

Les polyacides faibles soumis à l'expérimentation, à savoir les acides oxalique, citrique et éthylène-diamino-tétracétique (E.D.T.A.), sont déposés sur la ligne de départ, à raison de 1 μl . de solution aqueuse 0, 05 M.

La révélation des acides oxalique et citrique est effectuée par pulvérisation

d'une solution sulfurique de KMnO_4 ; les spots apparaissent sous la forme de taches claires sur un fond uniformément coloré.

La révélation de l'E.D.T.A. est obtenue par pulvérisation d'une solution aqueuse 0,01 M de Zn^{2+} , puis d'une solution aqueuse de Noir Eriochrome T, suivie d'une exposition aux vapeurs d'ammoniac ; au niveau des spots, le zinc complexé par l'E.D.T.A. n'est pas coloré par l'indicateur et des taches bleues apparaissent sur un fond rouge-violacé.

2 - Résultats expérimentaux.

Les courbes de la figure 6 objectivent les variations de la mobilité relative des trois polyacides étudiés en fonction du pH. Dans le tableau I sont mentionnées d'autre part les valeurs des pK_A de ces acides, déterminées expérimentalement par électrophorèse sur couches minces et comparées aux données récentes de la littérature (20). Ces résultats appellent les commentaires suivants.

a) *Acide oxalique.*

La différence entre les deux pK_A de cet acide, comprise entre 3 et 4 unités, se traduit par l'individualisation de deux courbes sigmoïdes, avec un palier intermédiaire assez nettement marqué. Ces deux pK_A peuvent être en principe déterminés graphiquement, sauf en ce qui concerne le premier, dont la valeur est obtenue par extrapolation de la courbe vers les pH inférieurs à l'unité.

b) *Acide citrique.*

Les valeurs des pK_A des trois fonctions carboxyliques de cet acide sont très voisines et, comme en Potentiométrie, elles ne permettent pas d'observer trois courbes sigmoïdes distinctes. Seule peut être effectuée graphiquement, sur la sigmoïde unique, la détermination d'un pK_A moyen à partir de l'abscisse du point d'inflexion, qui a pour valeur :

$$\text{pH} = \frac{1}{3} (\text{pK}_{A_1} + \text{pK}_{A_2} + \text{pK}_{A_3}).$$

c) Acide éthylène-diamino-tétra-acétique (EDTA).

On observe graphiquement deux courbes sigmoïdes, séparées par un palier nettement marqué. La première sigmoïde correspond à la dissociation pratiquement simultanée des deux premières fonctions acides, dont la différence des pK_A est inférieure à l'unité. Le pK_A global, qui peut être ainsi déterminé, est égal à la valeur de pH, correspondant à l'abscisse du point d'inflexion. La seconde sigmoïde reflète la dissociation de la troisième acidité, dont le pK_{A_3} , qui diffère d'environ 4 unités du pK_A précédent, peut être déterminé graphiquement. Enfin, l'amorce d'une troisième sigmoïde peut être observée, mais la détermination du pK_{A_4} , correspondant à la quatrième acidité et qui est supérieur à 10 unités, n'a pu être effectuée.

TABLEAU I

	pK_A expérimentaux	pK_A littérature (20)
Acide Oxalique	$pK_{A_1} = 1$ $pK_{A_2} = 4, 6$	$pK_{A_1} = 1, 1$ $pK_{A_2} = 4$
Acide Citrique	$\frac{pK_{A_1} + pK_{A_2} + pK_{A_3}}{3} = 3,85$	$pK_{A_1} = 3$ $pK_{A_2} = 4, 4$ 4, 43 $pK_{A_3} = 5, 9$ $pK_{A_4} = 16$
E.D.T.A.	$\frac{1}{2} (pK_{A_1} + pK_{A_2}) = 2,15$ $pK_{A_3} = 6, 6$	$pK_{A_1} = 2, 07$ $pK_{A_2} = 2, 75$ 2, 41 $pK_{A_3} = 6, 24$ $pK_{A_4} = 10, 34$

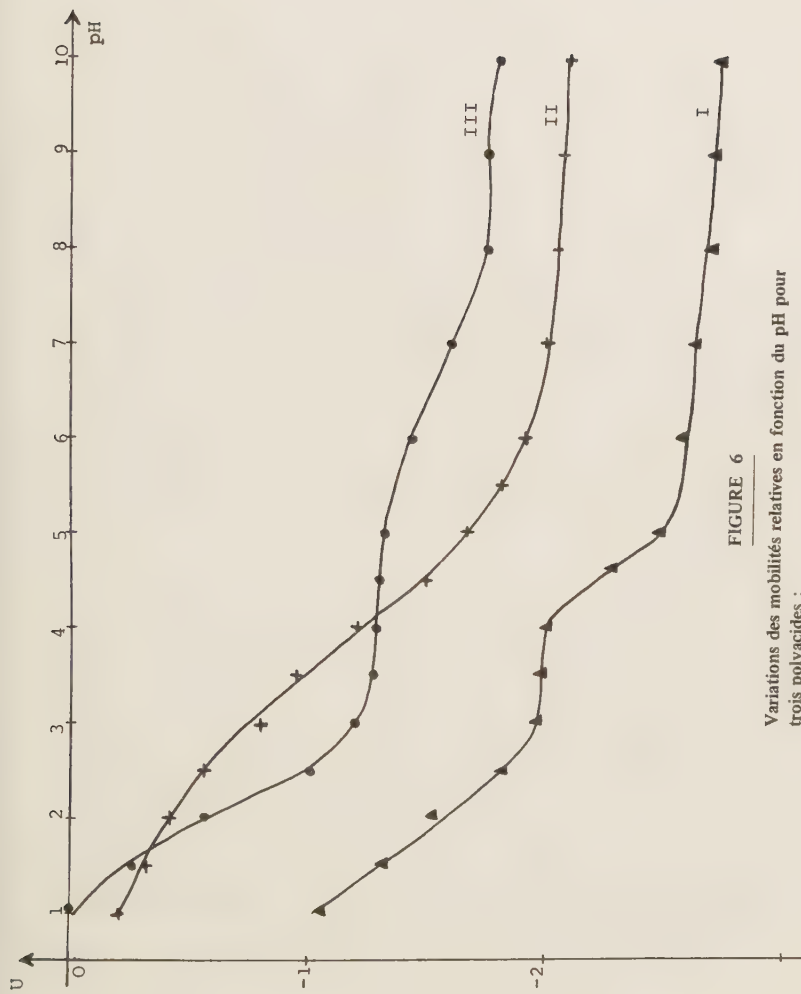


FIGURE 6

Variations des mobilités relatives en fonction du pH pour trois polyacides :

- Courbe I : ▲▲▲ Acide oxalique
- Courbe II : +++ Acide citrique
- Courbe III : ●●● E.D.T.A.

3 - *Discussion* .

Les valeurs des pK_A , déterminées par électrophorèse sur couches minces, pour les trois acides polycarboxyliques étudiés, ne sont pas toujours rigoureusement comparables aux valeurs données dans la littérature. Les différences observées peuvent déjà s'expliquer en partie par les conditions opératoires utilisées, telles que la nature du tampon, sa concentration et sa force ionique ; ces conditions ne sont pas forcément identiques, en effet, à celles des autres méthodes employées habituellement pour la détermination des pK_A .

Il faut considérer également que, si la mobilité d'un ion est essentiellement proportionnelle à sa charge, d'autres facteurs entrent en ligne de compte, tels que la structure de l'ion et surtout son rayon ionique, qui varie suivant son degré d'hydratation. Le degré d'hydratation d'une espèce ionique donnée augmente en fonction de sa charge et le volume des ions plurivalents étant plus important, leur mobilité n'est jamais un multiple entier de celle d'un ion monovalent de la même espèce.

C'est ce que l'on constate pour l'ion oxalate divalent, dont la mobilité observée expérimentalement n'est précisément pas le double de celle de l'ion monovalent, correspondant à l'oxalate acide. On constate également que la mobilité de l'ion trivalent, correspondant à l'EDTA, est inférieure non seulement à celle de l'ion citrate trivalent, mais aussi à la mobilité de l'ion oxalate divalent. On retrouve dans la littérature des observations identiques (6, 7, 30) , que les auteurs ont tenté d'expliquer. Les ions de petites dimensions, tels que l'ion oxalate divalent, engendrent un champ électrique très intense, qui aurait pour résultat la diminution apparente de leur degré d'hydratation. Leurs mobilités mesurées seraient ainsi plus élevées que ne le laisserait prévoir la théorie.

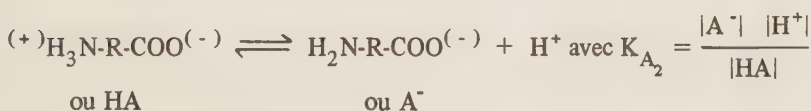
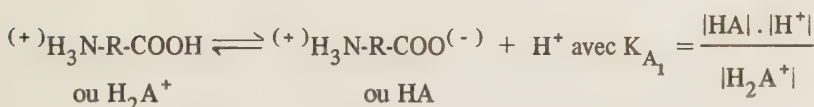
CHAPITRE V

AMINO – ACIDES

I - Application de la théorie générale.

1 - Cas d'un monoacide monoaminé : $H_2N-R-COOH$.

On peut envisager, en solution aqueuse, les équilibres suivants :



Si l'on désigne par u^+ la mobilité de H_2A^+ et par u^- la mobilité de A^- , la mobilité de HA étant $u_0 = 0$, la mobilité de zone de l'acide s'exprime par :

$$U = \frac{u^+ \cdot |H_2A^+| + u_0 \cdot |HA| + u^- \cdot |A^-|}{|H_2A^+| + |HA| + |A^-|}$$

et en fonction des constantes K_{A_1} et K_{A_2} , on a :

$$U = \frac{u^+ \cdot |H^+|^2 + u^- \cdot K_{A_1} \cdot K_{A_2}}{|H^+|^2 + K_{A_1} |H^+| + K_{A_1} \cdot K_{A_2}}$$

La fonction acide $(^+)H_3N^-$ étant toujours beaucoup plus faible que la fonction $-COOH$ (ΔpK généralement voisin de 6), il sera possible sur la courbe $U = f(pH)$ d'individualiser deux segments, correspondant respectivement aux équilibres de dissociation précédents. On montre facilement que, lors de l'établissement du premier équilibre, la concentration de A^- est négligeable, de même que la concentration de H_2A^+ lors de l'établissement du second équilibre. Les formes H_2A^+ et A^- seront en quantité équivalente pour un pH tel que :

$$pH = \frac{1}{2} pK_{A_1} + \frac{1}{2} pK_{A_2}$$

A un tel pH, la charge globale de l'acide est nulle et sa mobilité de zone également ; cette valeur de pH représente le point isoélectrique ou pH_i . Au point de vue de la mobilité électrophorétique, deux domaines de pH sont à envisager :

— $pH < pH_i$:
où la mobilité de zone s'écrit :

$$U = \frac{u^+ \cdot |H^+|}{K_{A_1} + |H^+|}$$

— $pH > pH_i$:
où la mobilité de zone s'écrit :

$$U = \frac{u^- \cdot K_{A_2}}{K_{A_2} + |H^+|}$$

Les deux courbes représentant les variations de U en fonction du pH dans ces deux domaines considérés sont des sigmoïdes, d'équation :

$$U = \frac{u^+}{2} \cdot \left[1 + \text{th.} \frac{2,3}{2} (pK_{A_1} - pH) \right]$$

et :

$$U = \frac{u^-}{2} \cdot \left[1 + \text{th.} \frac{2,3}{2} (pH - pK_{A_2}) \right]$$

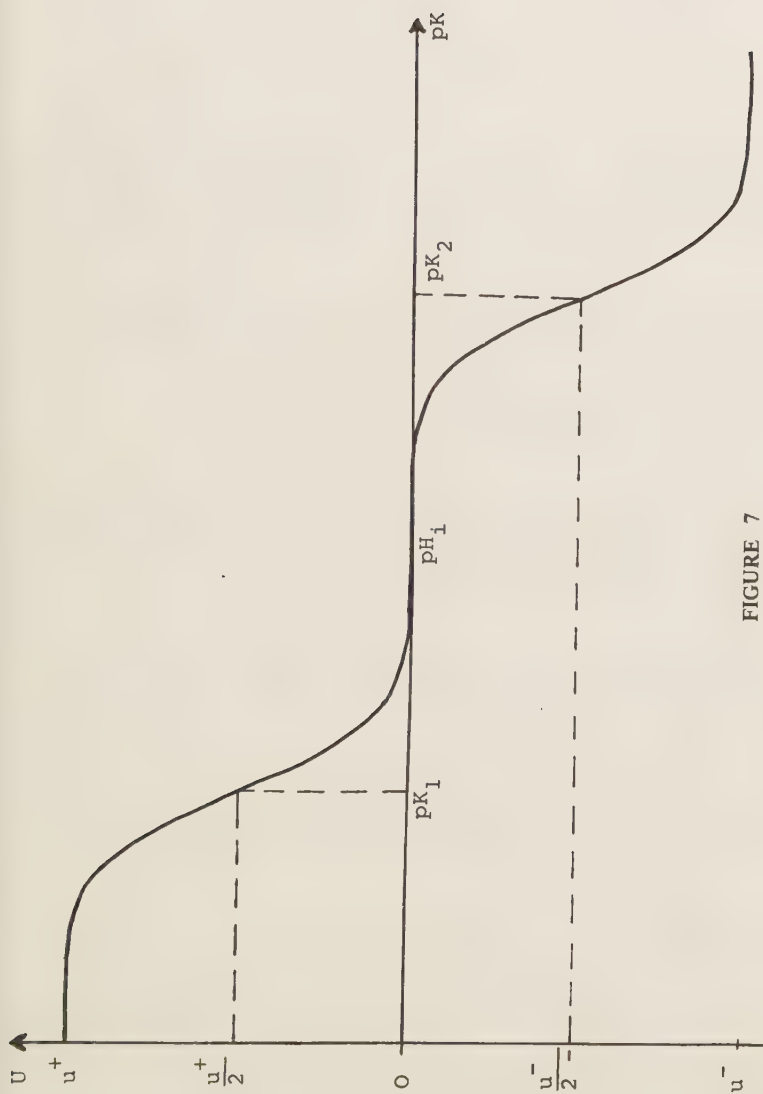


FIGURE 7

Courbe théorique représentant les variations en fonction du pH_i de la mobilité d'un acide aminé simple du type : $H_2N - R - COOH$.

En ce qui concerne le domaine des pH voisins du point isoélectrique, l'expression de la mobilité de zone est :

$$U = \frac{u^+ \cdot |H^+|^2 + u^- \cdot K_{A_1} \cdot K_{A_2}}{|H^+|^2 + K_{A_1} \cdot |H^+| + K_{A_1} K_{A_2}}$$

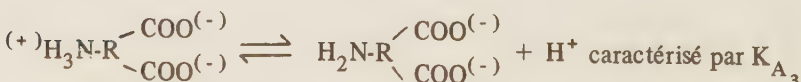
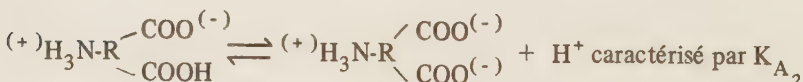
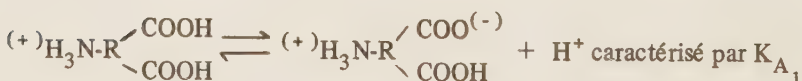
L'étude de la fonction $U = f(\text{pH})$ dans ce domaine est plus complexe, mais il est possible de montrer que la dérivée seconde de cette fonction s'annule pour $\text{pH} = \frac{1}{2} \text{pK}_{A_1} + \frac{1}{2} \text{pK}_{A_2}$.

La courbe représentative de cette fonction présentera un point d'inflexion pour la valeur de pH correspondant au point isoélectrique.

L'existence d'un palier au voisinage de pH_1 est conditionnée par $\Delta \text{pK} > \frac{4}{2,3}$ (v. polyacides).

2 - Cas des acides aminés dicarboxyliques : $H_2N - R = (COOH)_2$.

On peut envisager les trois équilibres suivants :



Pour des valeurs de pH croissantes, les équilibres précédents se produiront successivement. Deux cas sont à envisager :

— Les constantes K_{A_1} , K_{A_2} , K_{A_3} sont suffisamment différentes pour

donner lieu à trois courbes distinctes, comprises entre les paliers correspondant aux mobilités des formes H_3A^+ , H_2A , HA^- et A^{2-} et dont les équations sont obtenues à partir de la formule générale en ne tenant compte que des deux formes en équilibre au pH considéré.

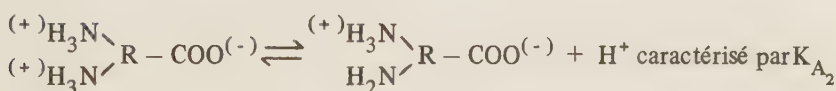
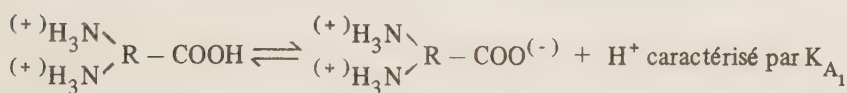
— La plupart du temps, les constantes K_{A_1} et K_{A_2} sont très voisines et K_{A_3} très différente. Le palier correspondant à H_2A disparaît et l'on obtient une sigmoïde unique pour les deux premiers équilibres, comprise entre les paliers des formes H_3A^+ et HA^- . Pour des pH plus élevés, une sigmoïde se différencie pour le troisième équilibre.

Dans le cas envisagé, la mobilité de zone s'annule pour une valeur de pH caractéristique, correspondant au point isoélectrique de l'acide aminé :

$$pH = pH_i = \frac{1}{2} pK_{A_1} + \frac{1}{2} pK_{A_2}$$

3 - Cas des monoacides diaminés : $(H_2N)_2 = R - COOH$.

On peut envisager les trois équilibres suivants :



L'analyse des courbes $U = f(pH)$ est effectuée de la même manière et deux cas sont à envisager :

a) Les constantes K_{A_1} , K_{A_2} et K_{A_3} sont suffisamment différentes, pour donner lieu à trois courbes distinctes, comprises entre les paliers correspondant aux mobilités des formes H_3A^{2+} , H_2A^+ , HA et A^- . Les équations de ces mobilités sont obtenues à partir de la formule générale, en ne tenant compte que des deux formes en équilibre au pH considéré. En ce qui concerne le premier équilibre, la mobilité de zone est donnée par :

$$U = \frac{u^{2+} \cdot |H^+| + u^+ \cdot K_{A_1}}{|H^+| + K_{A_1}}$$

où u^{2+} et u^+ correspondent respectivement aux mobilités de H_3A^{2+} et de H_2A^+ . La courbe représentative des variations de U en fonction du pH, dans le domaine considéré, est une sigmoïde d'équation :

$$U = \frac{u^{2+} + u^+}{2} + \left[\frac{u^{2+} - u^+}{2} \text{ th. } \frac{2,3}{2} (pK_{A_1} - pH) \right]$$

b) La plupart du temps K_{A_1} est très différente de K_{A_2} et de K_{A_3} et la première sigmoïde, comprise entre les paliers des formes H_3A^{2+} et H_2A^+ , se différencie nettement. Quant à K_{A_2} et K_{A_3} leurs valeurs sont parfois suffisamment éloignées pour permettre l'individualisation de chaque sigmoïde correspondante (cas de l'histidine). La valeur de pHi , correspondant à une mobilité nulle, sera donnée par :

$$pH = pHi = \frac{1}{2} pK_{A_2} + \frac{1}{2} pK_{A_3}$$

II - Expérimentation.

1 - Protocole expérimental.

Les bases de l'expérimentation ont été exposées précédemment. Le protocole expérimental reste sensiblement le même, sauf en ce qui concerne

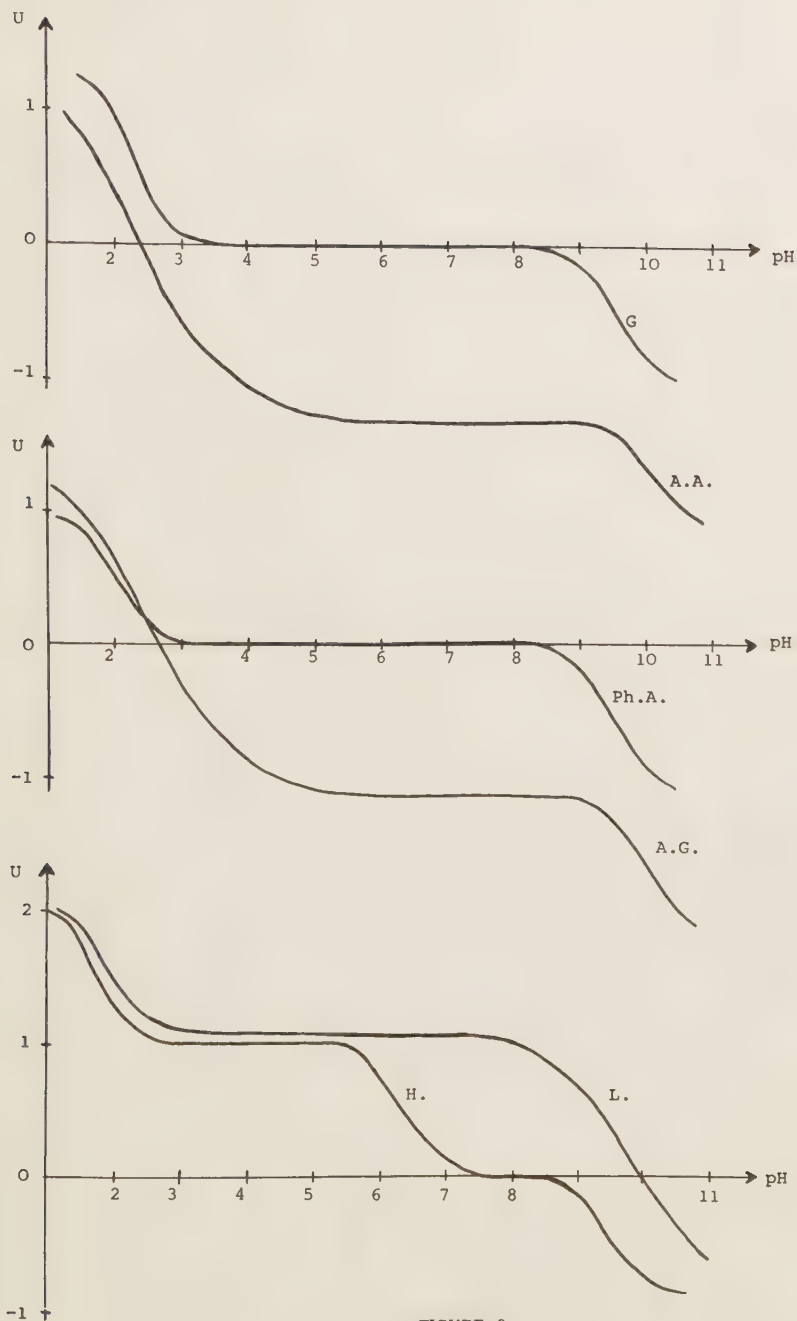


FIGURE 8

Variations des mobilités relatives en fonction du pH pour les amino-acides suivants :

G : Glycine	A.A. : Acide aspartique
Ph.A. : Phényl-alanine	A. G. : Acide Glutamique
L. : Lysine	H. : Histidine

	pK_A expérimentaux	pK_A littérature (24)
Glycine	$pK_{A_1} = 2,35$ $pK_{A_2} = 9,55$ $pH_i = 5,95$	$pK_{A_1} = 2,34$ $pK_{A_2} = 9,60$ $pH_i = 5,97$
Phénylalanine	$pK_{A_1} = 2,00$ $pK_{A_2} = 9,50$ $pH_i = 5,75$	$pK_{A_1} = 2,21$ $pK_{A_2} = 9,18$ $pH_i = 5,70$
Ac. Aspartique	$\frac{1}{2} (pK_{A_1} + pK_{A_2}) = pH_i = 2,40$ $pK_{A_3} = 10,25$	$pK_{A_1} = 1,88$ $pK_{A_2} = 3,65$ $pH_i = 2,76$ $pK_{A_3} = 9,60$
Ac. Glutamique	$\frac{1}{2} (pK_{A_1} + pK_{A_2}) = pH_i = 2,70$ $pK_{A_3} = 10,05$	$pK_{A_1} = 2,30$ $pK_{A_2} = 4,28$ $pH_i = 3,29$ $pK_{A_3} = 9,67$

	pK _A expérimentaux	pK _A littérature (24)
Histidine	$pK_{A_1} = 1,90$ $pK_{A_2} = 6,40$ $pH_i = 7,98$ $pK_{A_3} = 9,55$	$pK_{A_1} = 1,82$ $pK_{A_2} = 6,08$ $pH_i = 7,64$ $pK_{A_3} = 9,20$
Lysine	$pK_{A_1} = 2,05$ $\frac{1}{2} (pK_{A_2} + pK_{A_3}) = pH_i = 9,90$	$pK_{A_1} = 2,18$ $pK_{A_2} = 9,18$ $pH_i = 9,95$ $pK_{A_3} = 10,72$

TABLEAU II

la solution tampon, de force ionique 0,1 et renfermant les acides borique, acétique et phosphorique, à raison de 0,2 mole/l. pour chacun d'entre eux.

On dépose sur la ligne de départ 1 μ l. de solution aqueuse 0,025 M de chacun des acides aminés étudiés, qui en fin d'expérience sont révélés par la ninhydrine.

2 - Résultats expérimentaux .

Les courbes de la figure 8 représentent les variations de la mobilité de zone, en fonction du pH, de quelques amino-acides, appartenant aux groupes suivants :

- Monoacides monoaminés : Glycine et Phénylalanine,
- Diacides monoaminés : Acides aspartique et glutamique,
- Monoacides diaminés : Lysine et Histidine.

Les pK_A et les pH_i de ces différents acides, déterminés expérimentalement, sont comparés dans le tableau II aux valeurs correspondantes, citées dans la littérature (24) .

a) Glycine et Phénylalanine.

Les deux pK_A de chacun de ces acides aminés étant très différents, le palier intermédiaire, très nettement marqué, correspond effectivement, comme la théorie le laisse prévoir, à une mobilité nulle et permet de calculer la valeur du pH_i .

b) Acides Aspartique et Glutamique .

Pour ces deux acides aminés, on observe tout d'abord une sigmoïde unique, correspondant aux dissociations simultanées de leurs deux fonctions carboxyliques. Les valeurs de pK_{A_1} et de pK_{A_2} étant trop voisines (inférieures à 2 unités) , l'examen graphique ne permet donc que la détermination d'un pK_A moyen, correspondant précisément à la valeur du point isoélectrique.

c) Lysine et Histidine .

Ces deux exemples offrent une vérification complémentaire de l'importance du ΔpK dans l'individualisation de deux sigmoïdes successives.

Ainsi, pour la Lysine, la différence entre pK_{A_2} et pK_{A_3} est inférieure à deux unités et ne permet que la détermination expérimentale d'un pK_A moyen, dont la valeur est égale au pH_i de l'acide aminé.

Par contre, l'Histidine possède trois pK_A suffisamment éloignés et la courbe $U = f(pH)$ se différencie parfaitement en trois sigmoïdes distinctes, permettant d'une part la détermination de chacune de ces constantes et d'autre part le pH_i correspondant au milieu du palier, d'ordonnée $U = 0$.

3 - Discussions .

L'examen du tableau II montre, dans l'ensemble, une concordance satisfaisante entre les constantes déterminées par électrophorèse sur couches minces et les valeurs correspondantes de la littérature.

Les meilleurs résultats ont été obtenus pour la Glycine, la Phénylalanine et l'Histidine, mais les divergences observées pour les autres acides aminés sont en général très minimes, surtout en ce qui concerne les points isoélectriques. Il convient de souligner, à ce propos, que les valeurs de pK_A données dans la littérature ont été souvent obtenues à l'aide de méthodes différentes et dans des conditions expérimentales très variées.

CHAPITRE VI

COMPLEXES CITRIQUES

L'étude de la stabilité en fonction du pH des complexes de l'acide citrique avec certains cations métalliques présente une grande analogie avec celle des polyacides faibles et des acides aminés.

En solution aqueuse en effet et dans l'intervalle de pH étudié, l'acide citrique semble donner, avec divers cations métalliques bivalents (Cu, Ni, Co, Mn, Zn), de véritables complexes métallo-acides faibles, dont la stabilité peut être déterminée par l'analyse des courbes $U = f(\text{pH})$, obtenues expérimentalement.

Utilisant l'électrophorèse sur papier, Kiso (10) a décrit une méthode analogue, dont le principal mérite, semble-t-il, réside dans son originalité. En effet, plusieurs critiques peuvent être adressées à ce travail : en ce qui concerne le protocole expérimental, on constate tout d'abord des variations importantes, d'une expérience à l'autre, des proportions entre l'agent complexant (acide citrique) et les différents cations étudiés ; l'utilisation d'ions Cl^- , dans l'ajustage de la force ionique, est susceptible d'autre part d'introduire des causes d'erreur importantes, dues à une complexation parasite de certains cations. De plus, l'absence d'ions de référence, permettant de corriger les mobilités de zone, fait planer un doute sur la validité des mesures effectuées.

Enfin, dans l'interprétation de ses résultats expérimentaux, Kiso considère les complexes métalliques de l'acide citrique, non comme des complexes métallo-acides faibles, du type MH_nCi , mais comme des complexes mononucléaires du type MCi_n , pour lesquels l'interprétation des courbes $U = f(\text{pH})$ est fort différente.

Aussi, nous a-t-il paru indispensable de reprendre cette étude par électrophorèse sur couches minces de cellulose, en adoptant des conditions opératoires plus rigoureuses et un mode d'interprétation en rapport avec les données récentes de la littérature (20).

I - Application de la théorie générale.

Les complexes métallo-acides, susceptibles de se former entre l'acide citrique et certains cations bivalents (Cu, Ni, Co, Mn, Zn), sont caractérisés par les équilibres suivants :



Si l'on veut exprimer la mobilité de zone globale d'un tel système, on aboutit à la relation générale :

$$U = \frac{u_0 |M^{2+}| + u_1 |MH_3Ci^+| + u_2 |MH_2Ci^\circ| + u_3 |MHCi^-| + u_4 |MCi^{2-}|}{|M^{2+}| + |MH_3Ci^+| + |MH_2Ci^\circ| + |MHCi^-| + |MCi^{2-}|}$$

dans laquelle u_0 est la mobilité du cation libre, u_1, u_2, u_3 et u_4 les mobilités respectives des complexes successifs, la mobilité nulle $u_2 = 0$ correspondant au complexe de charge nulle MH_2Ci° .

En tenant compte de la concentration en acide citrique $C = |H_4Ci|$ et des constantes apparentes K' des équilibres précédents, telles que $K'_1 \cdot K'_2 \cdot K'_3 \cdot K'_4 = K'_{1,2,3,4}$, cette relation peut s'écrire :

$$U = \frac{u_0 + u_1 \frac{K'_1}{|H^+|} C + u_3 \frac{K'_{1,2,3}}{|H^+|^3} C + u_4 \frac{K'_{1,2,3,4}}{|H^+|^4} C}{1 + \frac{K'_1}{|H^+|} C + \frac{K'_{1,2}}{|H^+|^2} C + \frac{K'_{1,2,3}}{|H^+|^3} C + \frac{K'_{1,2,3,4}}{|H^+|^4} C}$$

Dans un domaine de pH correspondant à une courbe sigmoïde représentative de la fonction $U = f(\text{pH})$, cette relation se simplifie en ne tenant compte que des complexes prédominants.

Comme pour les acides faibles, ces complexes, qui ne diffèrent entre eux que par le nombre de protons fixés, ne doivent présenter d'une forme à l'autre qu'une variation faible de rayon ionique. Dans ce cas, les calculs peuvent se simplifier en admettant l'hypothèse, selon laquelle les mobilités sont essentiellement proportionnelles à la charge des ions : on a alors $u_1 \simeq -u_3$ et $u_4 \simeq 2u_3$.

1 - Constantes apparentes successives K' très différentes.

Dans ce cas idéal, la courbe représentative de la fonction $U = f(\text{pH})$ serait constituée de quatre sigmoïdes successives, parfaitement individualisées, qui permettraient une détermination aisée des constantes K' caractéristiques des quatre équilibres précédemment énoncés. Les équations de ces courbes seraient :

$$1. U = \frac{u_0 |H^+| + u_1 \cdot K'_1 \cdot C}{|H^+| + K'_1 \cdot C} = \frac{u_0 + u_1}{2} - \frac{u_0 - u_1}{2} \cdot \text{th.} \frac{2,3}{2} (\text{pH} - \text{p}K'_1 + \log C)$$

$$2. U = \frac{u_1 |H^+|}{|H^+| + K'_2} = \frac{u_1}{2} \left[1 - \text{th.} \frac{2,3}{2} (\text{pH} - \text{p}K'_2) \right]$$

$$3. U = \frac{u_3 \cdot K'_3}{|H^+| + K'_3} = \frac{u_3}{2} \left[1 + \text{th.} \frac{2,3}{2} (pH - pK'_3) \right]$$

$$4. U = \frac{u_3 |H^+| + u_4 \cdot K'_4}{|H^+| + K'_4} = \frac{3u_3}{2} + \frac{u_3}{2} \text{th.} \frac{2,3}{2} (pH - pK'_4)$$

Les différents pK' , accessibles graphiquement, seraient identiques aux valeurs de pH correspondant aux abscisses des points d'inflexion de chaque sigmoïde, c. à d. :

$$1. \quad pH_1 = pK'_1 - \log. C \quad \text{pour} \quad U = \frac{u_0 + u_1}{2}$$

$$2. \quad pH_2 = pK'_2 \quad \text{pour} \quad U = \frac{1}{2} u_1$$

$$3. \quad pH_3 = pK'_3 \quad \text{pour} \quad U = \frac{1}{2} u_3$$

$$4. \quad pH_4 = pK'_4 \quad \text{pour} \quad U = \frac{u_3 + u_4}{2} = \frac{3u_3}{2}$$

Par rapport aux polyacides faibles, la seule différence dans l'interprétation des courbes réside dans la nécessité de tenir compte pour la première sigmoïde située dans la zone des pH faibles, de la concentration C en acide citrique non dissocié. Or, cette concentration C varie en fonction du pH ; si l'on tient compte des différentes constantes K_A de l'acide citrique et si l'on exprime la concentration C' de l'acide, sous toutes ses formes, on peut écrire :

$$C' = |H_4Ci| + |H_3Ci^-| + |H_2Ci^{2-}| + |HCi^{3-}| + |Ci^{4-}|$$

$$\text{et } C' = C \cdot \left[1 + \frac{K_{A_1}}{|H^+|} + \frac{K_{A_{1,2}}}{|H^+|^2} + \frac{K_{A_{1,2,3}}}{|H^+|^3} + \frac{K_{A_{1,2,3,4}}}{|H^+|^4} \right]$$

$$\text{soit } C = \frac{C'}{1 + \frac{K_{A_1}}{|H^+|} + \frac{K_{A_{1,2}}}{|H^+|^2} + \frac{K_{A_{1,2,3}}}{|H^+|^3} + \frac{K_{A_{1,2,3,4}}}{|H^+|^4}}$$

Le calcul des dérivées première et seconde de la fonction $U = f(H)$ en vue de la détermination du point d'inflexion, a été effectué en considérant la concentration C comme constante. Cette approximation n'engendre pratiquement pas d'erreur appréciable, compte tenu de la dissociation très faible de l'acide citrique dans la zone de pH où se situe la première sigmoïde.

2 - Constantes apparentes successives K' très voisines.

Dans ce cas, l'individualisation des sigmoïdes successives, caractéristiques des différents équilibres de dissociation, s'avère impossible et l'on ne peut déterminer qu'une constante K' globale du système. La valeur de pH , constituant l'abscisse du point d'inflexion de la sigmoïde unique obtenue, représente effectivement la moyenne des pK' des équilibres successifs.

Cependant, si l'un des termes de l'équilibre est le cation lui-même, la détermination d'un pK' global n'est possible que si l'on admet l'hypothèse d'une proportionnalité entre la mobilité et la charge des ions en présence, c'est-à-dire avec $u_0 \approx 2u_1$.

Or, en solution aqueuse, la solvation des cations métalliques est importante et le remplacement, au cours de la réaction de complexation, d'une ou de plusieurs molécules de solvant par un ion complexant n'entraînerait finalement que de faibles variations du rayon ionique du cation solvaté. L'hypothèse précédente permettrait donc, en première approximation, de déterminer un pK' global, quels que soient les équilibres concernés.

Les courbes expérimentales, que nous avons obtenues (fig. 9 et 10), semblent d'ailleurs vérifier cette hypothèse, sauf peut-être dans le cas du

cation Mn^{2+} , pour lequel on a $u_0 < 2u_1$. L'explication de cette anomalie résiderait dans le fait que l'ion Mn^{2+} possède une mobilité plus élevée que les autres cations étudiés et arriverait ainsi plus rapidement à une extrémité de la couche de cellulose, où sa progression serait alors freinée par un courant liquide d'évaporation, plus important dans cette zone.

Dans le cas, où l'individualisation des sigmoïdes successives n'est plus possible, c'est-à-dire pour $\Delta pK' < \frac{4}{2,3}$, l'interprétation des courbes devient plus délicate. Les équations des courbes $U = f(pH)$ sont toujours des fonctions hyperboliques, mais ne correspondent plus à une fonction tangente hyperbolique pure.

Le raisonnement mathématique, identique dans tous les cas où deux équilibres successifs sont concernés, aboutit à une expression de la mobilité de zone du système, où apparaissent les fonctions sinus hyperbolique (sh) et cosinus hyperbolique (ch), en supposant que les mobilités restent proportionnelles à la charge des ions.

a) *Equilibres caractérisés par $K'_1 \simeq K'_2$.*

Dans ce cas, les formes prédominantes, dans la zone de pH étudiée, sont M^{2+} , MH_3Ci^+ , MH_2Ci^0 . La mobilité de zone du système s'exprime par :

$$U = u_1 \cdot \left[1 - \frac{\text{sh. } 2,3 \left[pH - \frac{1}{2} (pK'_1 + pK'_2 - \log.C) \right]}{\text{ch. } 2,3 \left[pH - \frac{1}{2} (pK'_1 + pK'_2 - \log.C) \right] + \frac{1}{2} \sqrt{\frac{K'_1 \cdot C}{K'_2}}} \right]$$

Cette fonction présente un point d'inflexion de coordonnées :

$$U = u_1 \quad \text{et} \quad pH = \frac{1}{2} (pK'_1 + pK'_2 - \log.C)$$

b) *Equilibres caractérisés par $K'_2 \simeq K'_3$.*

Les formes prédominantes sont MH_3Ci^+ , MH_2Ci^0 et $MHCi^-$ et la

mobilité de zone du système s'écrit :

$$U = -u_1 \cdot \left[\frac{\text{sh. 2,3} \left[\text{pH} - \frac{1}{2} (\text{pK}'_2 + \text{pK}'_3) \right]}{\text{ch. 2,3} \left[\text{pH} - \frac{1}{2} (\text{pK}'_2 + \text{pK}'_3) \right] + \frac{1}{2} \sqrt{\frac{\text{K}'_2}{\text{K}'_3}}} \right]$$

avec un point d'inflexion de coordonnées :

$$U = 0 \quad \text{et} \quad \text{pH} = \frac{1}{2} (\text{pK}'_2 + \text{pK}'_3)$$

c) *Equilibres caractérisés par $\text{K}'_3 \approx \text{K}'_4$.*

Les formes prédominantes sont $\text{MH}_2\text{Ci}^\circ$, MHCi^- et MCi^{2-} et la mobilité du système devient :

$$U = u_3 \cdot \left[1 + \frac{\text{sh. 2,3} \left[\text{pH} - \frac{1}{2} (\text{pK}'_3 + \text{pK}'_4) \right]}{\text{ch. 2,3} \left[\text{pH} - \frac{1}{2} (\text{pK}'_3 + \text{pK}'_4) \right] + \frac{1}{2} \sqrt{\frac{\text{K}'_3}{\text{K}'_4}}} \right]$$

avec un point d'inflexion de coordonnées :

$$U = u_3 \quad \text{et} \quad \text{pH} = \frac{1}{2} (\text{pK}'_3 + \text{pK}'_4)$$

3 - Cas expérimental.

Dans l'exemple relatif aux complexes métallo-acides de l'acide citrique, où les trois constantes successives K'_2 , K'_3 et K'_4 sont très voisines, l'interprétation de la courbe $U = f(\text{pH})$ n'est possible, que si l'on admet une nouvelle hypothèse.

Si l'on exprime, en effet, la mobilité de zone globale d'un tel système comprenant les complexes MH_3Ci^+ , $\text{MH}_2\text{Ci}^\circ$, MHCi^- et MCi^{2-} , en supposant que les mobilités sont essentiellement proportionnelles à la charge des

ions, on aboutit à la relation :

$$U = \frac{u_1 (|H^+|^3 - K'_2 \cdot K'_3 |H^+| - 2K'_2 \cdot K'_3 \cdot K'_4)}{|H^+|^3 + K'_2 |H^+|^2 + K'_2 \cdot K'_3 |H^+| + K'_2 \cdot K'_3 \cdot K'_4}$$

Si l'on prend sur la sigmoïde le point d'ordonnée $U = \frac{u_1 + u_4}{2} - \frac{u_1}{2}$

l'abscisse correspondante pH_g devra prendre une valeur telle que l'expression suivante soit vérifiée :

$$3 |H^+|^3 + K'_2 |H^+|^2 - K'_2 \cdot K'_3 |H^+| - 3K'_2 \cdot K'_3 \cdot K'_4 = 0$$

Cette relation ne permet pas une interprétation aisée de la courbe

$U = f(pH)$, à moins de supposer que :

$(K'_2 |H^+|^2) - (K'_2 \cdot K'_3 |H^+|) \simeq 0$ c'est-à-dire que $|H^+| \simeq K'_3$ ou $pH_g \simeq pK'_3$.

La relation précédente se réduit alors à :

$$3 |H^+|^3 - 3 \cdot K'_2 \cdot K'_3 \cdot K'_4 \simeq 0$$

et l'abscisse du point d'ordonnée $U = \frac{1}{2} u_1$ est : $pH_g \simeq \frac{1}{3} (pK'_2 + pK'_3 + pK'_4)$

il faut donc admettre que l'on a approximativement :

$$pK'_3 \simeq \frac{1}{3} (pK'_2 + pK'_3 + pK'_4)$$

Cette approximation sera d'autant plus valable que les trois pK' seront plus voisins et, étant donnée la forte pente de la courbe au point d'inflexion, l'erreur sur la détermination graphique de l'abscisse de ce point sera négligeable:

La mesure sera effectuée pour $U = \frac{u_1 + u_4}{2}$ et la valeur de pH

déterminée, soit pH_g , permettra de calculer facilement le pK' global du système ou pK'_g , selon :

$$pH_g \simeq \frac{1}{3} (pK'_2 + pK'_3 + pK'_4) = \frac{1}{3} pK'_g \text{ et } pK'_g \simeq 3pH_g$$

II - Expérimentation.

1 - Protocole expérimental .

Les bases de l'expérimentation et le protocole expérimental restent identiques, sauf en ce qui concerne l'électrolyte tampon et le procédé de révélation des divers composés étudiés.

L'électrolyte tampon est constitué par une solution aqueuse d'acide citrique et d'acide borique, permettant de tamponner correctement le milieu dans toute la gamme de pH prospectée. Des essais préliminaires nous ont montré qu'un excès d'acide citrique, compris entre 10 et 100 pour cent par rapport à la concentration des solutions de cations, n'entraînerait que des variations négligeables de la mobilité de zone des complexes formés. La concentration en acide citrique a donc été calculée, de manière à avoir en tous points de la plaque, une quantité constante d'agent complexant suffisante à la complexation permanente des cations durant la totalité de l'expérience. Le titre de la solution a été fixé à 0,25 M en acide borique et à 0,08 M en acide citrique ; le pH est ajusté à la valeur désirée par addition de NaOH et la force ionique est fixée à 0,7 par addition de KNO_3 .

Les cations étudiés, Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} et Zn^{2+} sont déposés sur la ligne de départ à raison de $2 \mu l$. de solution 0,04 M, de manière à ce que l'excès d'acide citrique à l'emplacement des dépôts soit d'environ 100 pour cent, après imprégnation de la couche mince par la solution tampon.

En fin d'électrophorèse, la révélation des cations est effectuée par pulvérisation d'une solution alcoolique à 0,1 % de Pyridyl-azo-naphtol (P.A.N.)

2 - Résultats expérimentaux.

Après avoir tracé la courbe représentative des variations de la mobilité

relative en fonction du pH pour chaque cation étudié (figures 9 et 10), nous avons cherché à identifier le complexe le plus probable susceptible de correspondre à chaque palier, compte tenu de la mobilité obtenue et de son signe.

A quelques rares exceptions, les valeurs de pK' des complexes métallo-acides envisagés n'ont pas été retrouvées dans la littérature, qui ne donne que des valeurs de pK_c correspondant à la dissociation de complexes du type :



Il est possible de calculer, à partir de ces valeurs, les pK' apparents, correspondant aux complexes métallo-acides, en tenant compte des différents pK_A de l'acide citrique.

Pour l'acide citrique, les différences ΔpK_A entre les trois premières acidités sont voisines de 1,5 unités et ne permettent donc pas l'individualisation éventuelle de trois sigmoïdes successives. De même, pour les complexes métallo-acides de l'acide citrique, il s'avère pratiquement impossible de différencier, sur les courbes expérimentales, les trois acidités restantes après la complexation du cation, sauf peut-être pour les complexes cuivriques.

Il paraît donc logique de prévoir, pour ces complexes, des différences de pK' du même ordre de grandeur que les différences de pK_A de l'acide citrique.

La seconde constatation intéressante concerne le mode de complexation des cations bivalents M^{2+} par une molécule d'acide citrique. Dans les cas où les valeurs de $pK'_g = pK'_2 + pK'_3 + pK'_4$ sont mesurables, elles sont presque toujours comprises entre 12 et 15, donc inférieures au pK_{A_4} de l'acide citrique, correspondant à la fonction alcool. Ceci tendrait donc à prouver que la complexation d'un cation M^{2+} par une molécule d'acide citrique s'effectue d'abord au détriment du proton alcoolique. La méthode de dosage des citrates neutres, fondée sur la libération d'un proton fort par complexation avec Cu^{2+} , semble également en faveur de cette hypothèse (20).

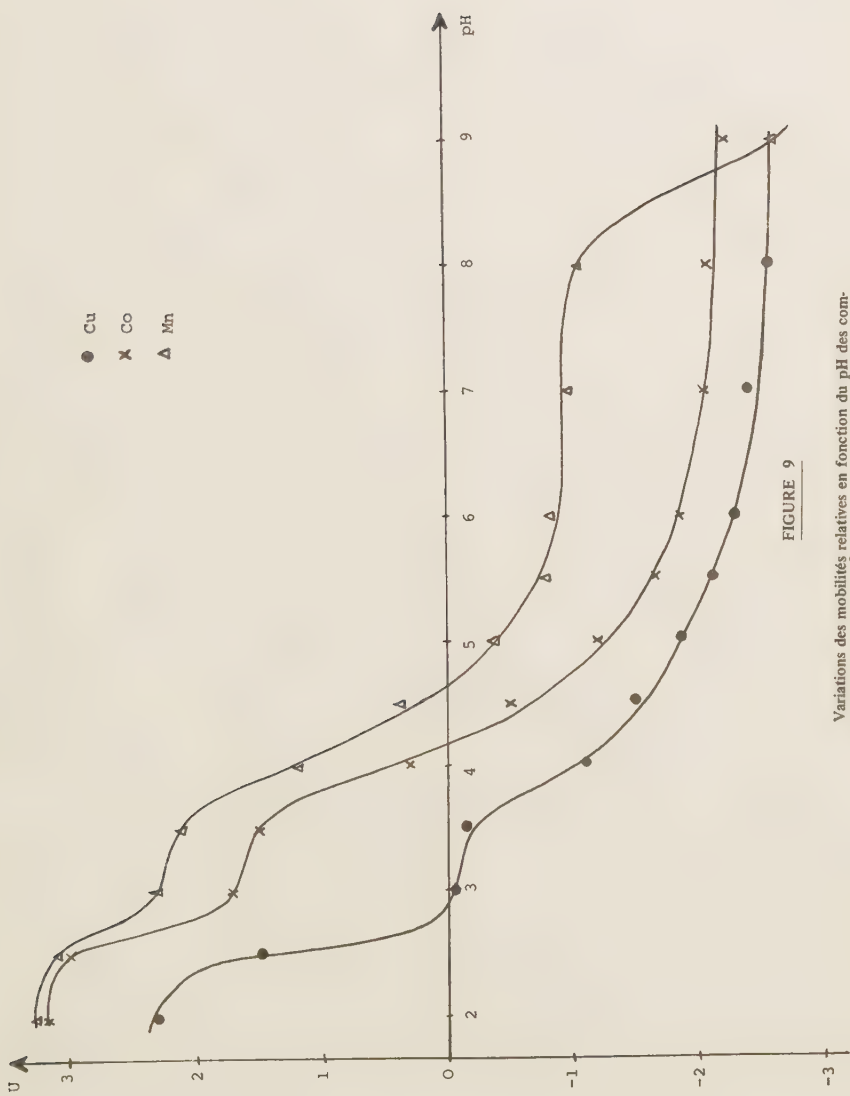


FIGURE 9

Variations des mobilités relatives en fonction du pH des complexes citriques de Cu^{2+} (● ● ●), de Co^{2+} (× × ×) et de Mn^{2+} (△ △ △).

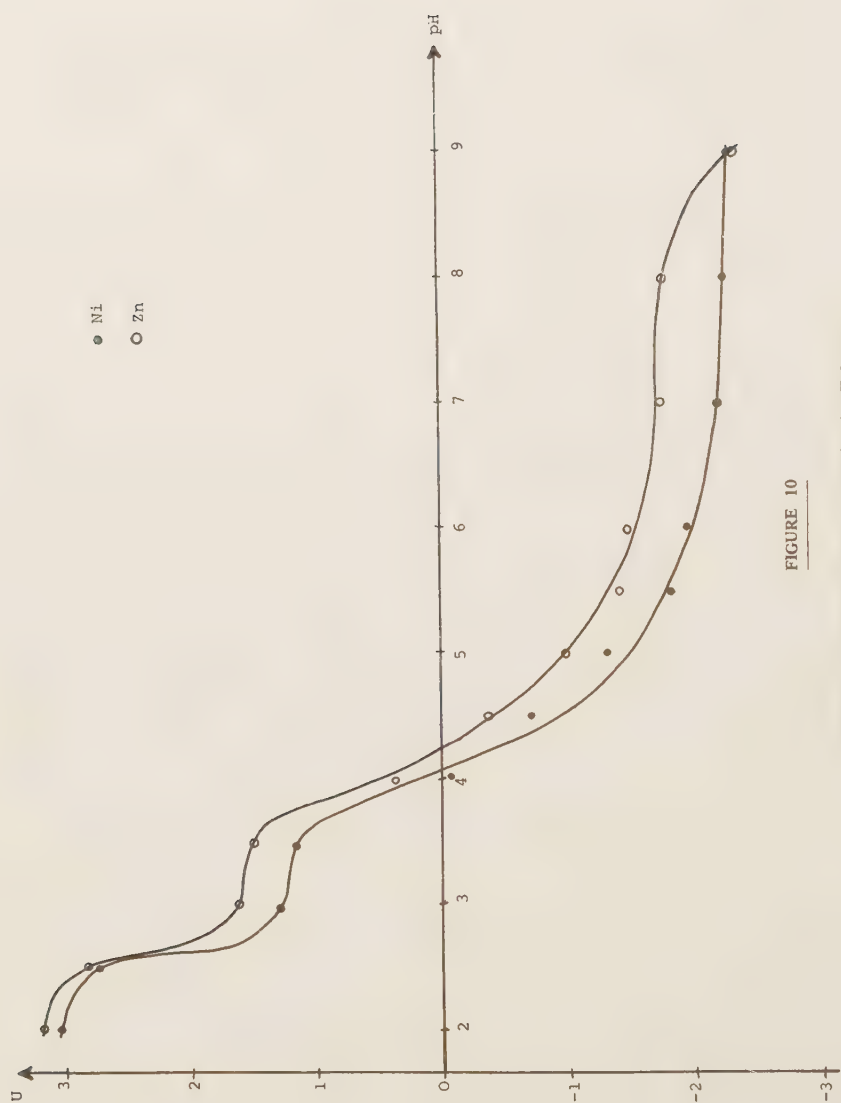


FIGURE 10

Variations des mobilités relatives en fonction du pH des complexes citriques de Ni^{2+} (●●●) et de Zn^{2+} (○○○)

TABLEAU III

Cations	pK' calculés	pK' expérimentaux
Cu^{2+}	$\text{pK}'_1 = 1,4$ $\text{pK}'_2 + \text{pK}'_3 = 5,9$ $\text{pK}'_4 = 4,1$ $\text{pK}'_{\text{tot.}} = 11,4$	$\text{pK}'_1 + \text{pK}'_2 = 3,85$ $\text{pK}'_3 + \text{pK}'_4 = 8,6$ $\text{pK}'_{\text{tot.}} = 12,45$
Ni^{2+}	$\text{pK}'_1 + \text{pK}'_2 = 4,4$ $\text{pK}'_3 = 4,2 \quad \text{pK}'_4 = 6,5$ $\text{pK}'_{\text{tot.}} = 15,1$	$\text{pK}'_1 = 1,4$ $\text{pK}'_2 + \text{pK}'_3 + \text{pK}'_4 = 12,9$ $\text{pK}'_{\text{tot.}} = 14,3$
Co^{2+}	$\text{pK}'_1 + \text{pK}'_2 = 4,5$ $\text{pK}'_3 = 4,5 \quad \text{pK}'_4 = 7,9$ $\text{pK}'_{\text{tot.}} = 16,9$	$\text{pK}'_1 = 1,44$ $\text{pK}'_2 + \text{pK}'_3 + \text{pK}'_4 = 12,9$ $\text{pK}'_{\text{tot.}} = 14,3$
Mn^{2+}	$\text{pK}'_1 + \text{pK}'_2 = 5,4$ $\text{pK}'_3 = 4,6$ $\text{pK}'_1 + \text{pK}'_2 + \text{pK}'_3 = 10$	$\text{pK}'_1 = 1,44$ $\text{pK}'_2 + \text{pK}'_3 = 8,6$ $\text{pK}'_1 + \text{pK}'_2 + \text{pK}'_3 = 10$
Zn^{2+}	$\text{pK}'_1 + \text{pK}'_2 = 4,7$ $\text{pK}'_3 = 4,2 \quad \text{pK}'_4 = 9,1$ $\text{pK}'_1 + \text{pK}'_2 + \text{pK}'_3 = 8,9$	$\text{pK}'_1 = 1,38$ $\text{pK}'_2 + \text{pK}'_3 = 8,48$ $\text{pK}'_1 + \text{pK}'_2 + \text{pK}'_3 = 9,86$

Les valeurs de pK' calculées ont été déterminées à partir des données publiées par Ringbom (20).

Les valeurs, rapportées dans le tableau III et correspondant aux courbes des figures 9 et 10, ne concernent en général que des pK' globaux, mais elles sont très voisines des pK' globaux calculés à partir des données de la littérature ; les différences observées entre les valeurs expérimentales et les valeurs calculées n'excèdent pas en général une unité.

BIBLIOGRAPHIE DE LA DEUXIEME PARTIE.

- 1 - BADZIO T. et POMPOWSKI T., J. Chromatog., 1969, 39, 344.
- 2 - BAILEY R.A. et STEGER A., J. Chromatog., 1965, 18, 374.
- 3 - BAILEY R.A. et STEGER A., J. Chromatog., 1966, 25, 442.
- 4 - BASOLO F. et PEARSON R.G., «Mechanisms of Inorganic Reactions», Wiley New-York, 1958.
- 5 - BIERNAT J., Roczn. Chem., 1964, 38, 343.
- 6 - FEATES F.S. et IVES D.J.G., J. Chem. Soc., 1956, 2798.
- 7 - GURNEY R.W., «Ionic Processes in Solution», Mac Graw Hill, New-York, 1953.
- 8 - HEFTMANN E., Chromatography, 2nd Ed., Reinhold Publ. Corp., 1967, p. 224 et 240.
- 9 - KISO Y., J. Sci. Hiroshima Univ., 1963, 27(1), 17.
- 10 - KISO Y., J. Sci. Hiroshima Univ., 1963, 27(1), 23.
- 11 - KISO Y., Kagaku N° Ryoiki, 1969, 23(2), 181 et 23(3), 283.
- 12 - KISO Y., KOBAYASHI M., KITAOKA Y., KAWAMOTO K. et TAKADA J., J. Chromatog., 1968, 36, 215.
- 13 - KUNKEL H.G., Conference on Hemoglobin, Nat. Acad. of Science, Nat. Res. Council, Washington D.C., 1958, p. 157.
- 14 - MAZZEI M. et LEDERER M., J. Chromatog., 1967, 31, 196.
- 15 - MICHL H., Monatsh., 1952, 83, 737.
- 16 - MILLER G.L., J. Chromatog., 1960, 3, 570.
- 17 - MILLER J., PICKERING W.F. et WARD F.L., Anal. Chim. Acta, 1956, 14, 538.
- 18 - RINGBOM A., J. Chem. Educ., 1958, 35, 282.
- 19 - RINGBOM A., «Complexation Reactions», ds. Kolthoff I.M. et Elving P.J. (Ed.) Treatise on Analytical Chemistry, Part I, Vol. I, Interscience, New-York-London, 1959, 14.

- 20 - RINGBOM A., «Les Complexes en Chimie Analytique», Dunod, Paris, 1967.
 - 21 - SATO T.R., NORRIS W.P. et STRAIN H.H., Anal. Chem., 1955, 27, 521.
 - 22 - SCHWARZENBACH G., «Complexometric Titrations», Interscience New-York, 1957.
 - 23 - SMITH I. (Ed.), «Chromatographic and Electrophoretic Techniques», 2nd Ed., 1968, Vol. II, p. 10.
 - 24 - STABILITY CONSTANTS, special publication, n° 17, London, The Chemical Society, 1964.
 - 25 - STEFANOVITCH V., J. Chromatog., 1967, 31, 466.
 - 26 - STRAIN H.H., Anal. Chem., 1952, 24, 356.
 - 27 - TAUBE H., Chem. Rev., 1952, 50, 69.
 - 28 - VACIK J. et DVORAK J., Collection Czech. Chem. Commun., 1966, 31(2), 863.
 - 29 - WALDRON-EDWARD D., J. Chromatog., 1965, 20, 556.
 - 30 - WANG J.H., J. Phys. Chem., 1954, 58, 686.
 - 31 - WERUM L.N., GORDON H.T. et THORNBURG W., J. Chromatog., 1960, 3, 125.
-

CONCLUSIONS

La première partie de notre travail consiste en une synthèse bibliographique des données théoriques et expérimentales, qui ont permis d'établir les bases physiques et physico-chimiques des processus électrophorétiques et plus particulièrement de l'électrophorèse sur support.

Des études approfondies ont été effectuées pour élucider les phénomènes complexes, qui se produisent au sein d'un support solide et déterminer ainsi l'influence de ce dernier sur la migration ionique. Il est donc possible désormais d'obtenir des mobilités électrophorétiques des indications précises sur les propriétés physiques et physico-chimiques des ions ou des molécules étudiées.

Parmi les nombreux facteurs, qui influent sur ces mobilités, nous avons distingué d'une part les « paramètres ioniques ou moléculaires » et d'autre part les « paramètres expérimentaux ».

Les paramètres ioniques ou moléculaires sont liés à la nature même de l'ion ou de la molécule, c'est-à-dire à sa charge, à ses dimensions et à sa forme ; les paramètres expérimentaux dépendent des conditions opératoires, c'est-à-dire du milieu support (paramètres de zone), de l'électrolyte tampon (paramètres libres), ainsi que de la température d'expérience.

Un dernier chapitre de cette partie bibliographique a été consacré en outre aux applications de l'électrophorèse sur papier à la détermination de la stabilité en solution des complexes organo-minéraux de faible poids moléculaire. Ce chapitre constitue en quelque sorte une transition logique à la seconde partie, où sont exposées nos recherches personnelles à la fois théoriques et expérimentales.

Après un rappel indispensable des données physico-chimiques les plus récentes sur les complexes et en particulier celles qui concernent les notions de « labilité » et « d'inertie », une étude théorique détaillée fait l'objet du second chapitre. Elle consiste essentiellement dans l'établissement d'une équation générale de la mobilité électrophorétique de composés chimiques en équilibre, susceptibles de se transformer mutuellement au cours de leur migration. Cette relation a été développée tout particulièrement en vue de l'étude des complexes labiles, dont les vitesses de transformation sont très rapides. En s'appuyant sur la notion d'équilibre « dynamique » des systèmes réversibles, il a été possible de donner une définition satisfaisante de la mobilité « de zone » électrophorétique et de démontrer son expression mathématique.

Ces raisonnements ont été appliqués ensuite au cas des mono-acides faibles qui peuvent être considérés comme de véritables complexes du proton. Les variations de leur mobilité de zone en fonction du pH sont représentées graphiquement par une sigmoïde, dont les asymptotes caractéristiques correspondent respectivement à une mobilité nulle pour la molécule d'acide faible non dissociée et à la mobilité de l'anion provenant de sa dissociation. Cette représentation graphique permet une détermination simple du pK_A et par conséquent une évaluation de la stabilité de l'acide dans les conditions opératoires choisies.

Dans le but de confirmer ces données théoriques, nous avons entrepris plusieurs séries d'expériences, portant sur la détermination des mobilités de différents types d'acides faibles par électrophorèse sur couches minces de cellulose. Plusieurs raisons nous ont amené à préférer cette technique à l'électrophorèse sur papier. Avec les supports pour couches minces, plaques de verre ou feuilles de plastique, il est possible tout d'abord d'obtenir, en cours d'électrophorèse, une meilleure réfrigération du substrat, phénomène essentiel pour la reproductibilité des résultats. D'autre part, la technique sur couches minces n'avait pratiquement pas encore été utilisée pour des recherches de ce type et, outre la cellulose, elle permet l'emploi d'autres substrats de nature extrêmement variée, minérale ou organique, pouvant être le siège de phénomènes très intéressants, en particulier les échangeurs d'ions.

L'étude systématique des différents paramètres, susceptibles d'influencer les migrations ioniques au sein d'un support solide, nous a conduit à fixer de façon précise les bases de l'expérimentation, qui sont développées dans le chapitre III et à mettre au point un protocole expérimental parfaitement défini.

Une première série d'expériences a porté tout d'abord sur l'étude de quelques acides polycarboxyliques, les acides oxalique, citrique et éthylène-diamino-tétra-acétique (EDTA). L'application extensive de la théorie à ces polyacides, de même que les résultats expérimentaux obtenus sont relatés au chapitre IV. Le chapitre V est consacré à l'étude des amino-acides suivants : glycine et phényl-alanine, acides aspartique et glutamique, lysine et histidine. Comme précédemment, une application de la théorie générale a été développée, suivie des résultats expérimentaux et détaillés.

Pour chacun de ces acides, les variations de la mobilité de zone en fonction du pH sont représentées par une ou plusieurs sigmoïdes, suivant le nombre et le degré de dissociation des fonctions acides de la molécule.

Pour un polyacide donné, on démontre facilement que la différenciation électrophorétique de deux acidités successives, objectivées par deux sigmoïdes distinctes, n'est possible que si l'écart entre leurs constantes de dissociation respectives est suffisamment important. Dans ce cas le plus favorable, l'interprétation graphique de la courbe $U = f(\text{pH})$ conduit à une détermination satisfaisante des pK_A correspondants. Par contre, si les constantes de dissociation sont trop voisines, l'interprétation de la courbe ne permet d'obtenir qu'un pK_A global, représentant la somme des pK_A de chacune des acidités en cause. Dans l'ensemble, les résultats enregistrés sont en accord avec les données de la littérature, compte tenu des méthodes utilisées et de l'interprétation de certains phénomènes propres à l'électrophorèse.

Une dernière application expérimentale concerne les complexes de l'acide citrique avec divers cations métalliques bivalents (Cu, Ni, Co, Mn, Zn) qui dans la zone de pH étudiée, semblent correspondre effectivement à de véritables complexes métallo-acides faibles. L'expression mathématique des variations de leur mobilité de zone en fonction du pH est très voisine de celle qui

a été proposée pour les polyacides faibles et l'analyse des courbes expérimentales obtenues permet à la fois de prévoir l'existence de certains complexes successifs et de déterminer avec une bonne approximation les constantes de stabilité individuelles ou globales de ces complexes.

Sur le plan analytique, la comparaison des courbes $U = f(\text{pH})$, correspondant aux divers représentants d'une même série chimique, acides aminés ou complexes citriques par exemple, constitue une méthode sûre et efficace pour en définir les meilleures conditions expérimentales de séparation. A partir des équations de mobilités de deux composés complexes, il est possible en outre de calculer, en fonction du pH, les variations de la différence de leurs mobilités et de prévoir ainsi théoriquement le pH optimal de séparation.

Ces recherches expérimentales, réalisées uniquement sur couches minces de cellulose, représentent en fait une étude préliminaire indispensable en vue d'une expérimentation ultérieure systématique d'autres types de substrats ainsi que des complexes les plus variés.

Vu, le 15 Mars 1971

Le Président du Jury

J.A. BERGER

Vu et Permis d'Imprimer

N° 2/ 71/ Ph

Clermont-Ferrand, le 17 Mars 1971

Le Doyen

M. COULET

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
--------------------	---

PREMIERE PARTIE : BIBLIOGRAPHIE.

Données théoriques et techniques relatives à l'électrophorèse sur support	7
CHAPITRE I : Paramètres ioniques ou moléculaires	9
CHAPITRE II : Paramètres libres	17
CHAPITRE III : Influence du milieu support	31
CHAPITRE IV : Effet électro-osmotique	41
CHAPITRE V : Notion de « Flot du tampon »	51
CHAPITRE VI : Expression des mobilités électrophorétiques sur support	59
CHAPITRE VII : Etude de la stabilité des complexes par élec- trophorèse sur papier	67

DEUXIEME PARTIE : TRAVAUX PERSONNELS.

Application de l'électrophorèse sur couches minces à l'étude de la stabilité des complexes en solution.....	77
CHAPITRE I : Généralités	81
CHAPITRE II : Etude théorique des complexes labiles	87
CHAPITRE III : Bases de l'expérimentation	97
CHAPITRE IV : Acides faibles poly-carboxyliques	111
CHAPITRE V : Amino-acides	123
CHAPITRE VI : Complexes citriques	135
CONCLUSIONS	151
